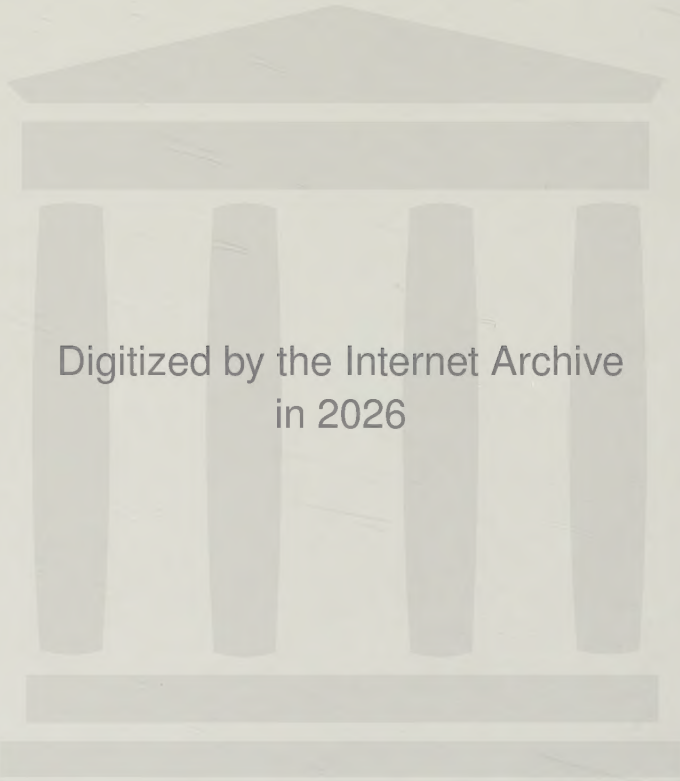




Digitized by the Internet Archive
in 2026

31P- und 23Na-kernspinresonanzspektroskopische
Untersuchungen des Energiemetabolismus der euryhalinen
Mikroalge *Platymonas subcordiformis*

Vorgelegt dem Fachbereich 1 (Physik/Elektrotechnik)
der Universität Bremen
als Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

von
Harald Kugel
aus Hamburg

im Januar 1988

Tag des öffentlichen Kolloquiums:

11. Februar 1988

Gutachter der Dissertation:

Prof. Dr. A. Mayer-Heinricy
Prof. Dr. D. Leibfritz

Beisitzer der Prüfung:

Prof. Dr. H. Diehl
Prof. Dr. G. O. Kirst

Abstract

Investigations of the energy metabolism of marine algae using NMR spectroscopy are presented, concentrating on four subjects:

- The influence of media of high salinity on NMR spectra is investigated: Spectra taken from cells in media of high salinity suffer from an inferior signal to noise ratio that decreases as the square of the electric conductivity of the sample. Different susceptibilities inside and outside the cells result in line broadening. If the differences are large, special shapes of cells - spherical or rodlike (with axis parallel to the magnetic field) - are advantageous.
- The energy metabolism of glycolysing, respiring, and photosynthesizing cells of the euryhaline microalga *Platymonas subcordiformis* is investigated. Their spectra give pH values and metabolite concentrations, allowing inference of cellular energy supply. Algae living on glycolysis as their only energy source have a cytoplasmic pH about 7.1 - as determined from the position of the P_i signal - a high concentration of P_i , and a low concentration of ATP. In respiring cells the cytoplasmic pH is about 0.4 units more alkaline, the P_i peak is smaller, the ATP peaks are larger, and a pronounced peak of PArg is visible. Spectra of cells which are illuminated differ little from those of respiring cells in the dark. The different types of spectra represent different states of metabolism, characterized by different quantities of energy transported through the adenylate system per unit time.

Investigations of the polyP signal reveal that polyP is not located outside the plasmamembrane of *Platymonas subcordiformis*, in contrast to some other microorganisms. polyP chains may form in several discrete conformations, dependent upon the ratio of complexed divalent cations to phosphate residues in the chain.

- The metabolism of *Platymonas* cells as related to external pH is investigated with special focus on the regulation of intracellular pH: The appearance of the spectra typical of a particular metabolic state is unaffected by changes in external pH within a wide range. The limits of pH homeostasis, however, differ between respiring cells and

cells solely glycolysing. The former retain their normal cytoplasmic pH for external pH values from 5 to more than 12, while in the latter intracellular pH is less stable below external pH 6 and external pH of more than 11 cause hydrolysis of intracellular polyP.

Comparison of the minimal power necessary to keep intracellular pH stable at various external pH values by ATP consuming processes to the estimated power available to aerobic and to anaerobic cells in the dark shows that different energy turnover may possibly explain the different behaviour of these cells when exposed to extreme pH values.

- Intracellular Na^+ concentrations are measured using ^{23}Na NMR spectroscopy: Addition of suitable shift reagents to the medium causes separation of intra- and extracellular Na^+ signals even in seawater media. The intracellular concentration of about $50 \text{ mmol Na}^+ \text{ l}^{-1}$, which is determined at $400 \text{ mmol Na}^+ \text{ l}^{-1}$ in the medium, does not differ significantly from the values measured at reduced concentrations of Na^+ in isotonic solutions of sorbitol. Advantages and disadvantages of the application of the shift reagents DyTP_2 and DyTTHA to *Platymonas* are discussed.

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
Gegenstand und Gliederung der Arbeit	1
2. Grundlagen der Kernspinresonanzspektroskopie	4
2.1. Theoretische Grundlagen	4
2.1.1. Das kernmagnetische Moment	4
2.1.1.1. Der Kernspin	4
2.1.1.2. Das gyromagnetische Verhältnis	4
2.1.1.3. Die Besetzung von Energieniveaus	5
2.1.1.4. Die Einstellung eines thermischen Gleichgewichtes	6
2.1.2. Das kernmagnetische Moment im äußeren Magnetfeld	7
2.1.2.1. Die Bloch'schen Gleichungen	7
2.1.2.2. Das magnetische Moment nach einem Puls	10
2.1.2.3. Die Fourier-Transformation	11
2.1.3. Die chemische Verschiebung	12
2.1.4. Spin-Spin-Kopplung	13
2.1.5. Relaxationsmechanismen	14
2.2. Die Elemente des Spektrometers	18
3. Aufbau und Energiestoffwechsel autotropher Mikroorganismen	21
3.1. Aufbau einer autotrophen eukariotischen Zelle	21
3.2. Das Adenylatsystem	24
3.3. Die Photophosphorylierung	26
3.4. Die Glykolyse	28
3.5. Die oxidative Phosphorylierung	29
4. Anwendung der ^{31}P -NMR-Spektroskopie auf lebende Mikroorganismen in salzhaltigen Medien	33
4.1. Der Einfluß von Ionen auf NMR-Spektren	33
4.1.1. Einführung: Ionen in biologischen Proben	33
4.1.2. Untersuchungen zum Signal-Rausch-Verhältnis	34
4.1.2.1. Einführung: Ψ im NMR-Experiment	34
4.1.2.2. Berechnungen von Ψ aus meßbaren Größen	37
4.1.2.3. Magnetische und dielektrische Verluste	40
4.1.2.4. Messungen zur Überprüfung des Modells	44
4.1.2.5. Ergebnisse der Messungen	47
4.1.2.6. Diskussion	52

4.1.3.	Einfluß der Probenssuszeptibilität auf die Signale	56
4.1.3.1	Lokale Felder und die chemische Verschiebung	56
4.1.3.2	Lokale Felder in den Kompartimenten der Probe	57
4.1.3.3	Eine Methode zur Bestimmung der Suszeptibilität	60
4.1.3.4	Linienverbreiterung durch Feldinhomogenitäten	62
4.2.	Durch NMR-Spektroskopie beobachtbare Parameter	65
4.2.1	Metabolitenkonzentrationen	65
4.2.2.	Intrazelluläre pH-Werte	68
4.2.2.1	Die chemische Verschiebung als Funktion des pH	68
4.2.2.2	Anorganisches Phosphat als pH-Sonde	70
4.2.2.3	Methoden der Eichung	73
4.2.2.4	Die Bestimmung der Pufferkapazität mit NH_4Cl	74
4.3	Verbindungstypen im Phosphatspektrum	76
5.	^{31}P-Untersuchungen an der Alge <i>Platymonas subcordiformis</i>	82
5.1	Einführung: Cytologie von <i>Platymonas</i>	82
5.2	Kultivierung von <i>Platymonas subcordiformis</i> und Vorbereitung der Probe für spektroskopische Untersuchungen	85
5.3.	Die Versorgung der Probe während der Messung	87
5.3.1	Der Probenbehälter	87
5.3.2	Gasversorgung für anaerobe und aerobe Bedingungen	88
5.3.3	Belichtung	89
5.4	pH-Messungen an <i>Platymonas</i> : Eichung	92
5.5.	Typische Spektren unter Standardbedingungen	94
5.5.1.	Die Zuordnung der Signale	94
5.5.1.1	Anorganisches Phosphat	95
5.5.1.2	Phosphomonoester	96
5.5.1.3	Signale in der Diester-Region	100
5.5.1.4	Phosphagene und Nukleotide	100
5.5.1.5	Anorganisches Polyphosphat	102
5.5.2.	Zellen in unterschiedlichen Energiezuständen	104
5.5.2.1	Charakteristika der Spektren	104
5.5.2.2	Metabolitenkonzentrationen	109
5.5.2.3	Kennzahlen des Energiehaushaltes	116
5.5.3.	Diskussion des Energiestoffwechsels von <i>Platymonas</i> bei verschiedenen Meßbedingungen	118
5.5.3.1	Leistungsbedarf und Leistungsvermögen von Zellen	118
5.5.3.2	Abschätzung der Leistung von <i>Platymonas</i> unter aeroben und anaeroben Bedingungen	121
5.5.3.3	Die Einstellung neuer Gleichgewichte nach Änderung der Gasversorgung	124
5.5.3.4	Die Einstellung des intrazellulären pH	126

	Seite
5.6. Der Stoffwechsel in Abhängigkeit vom pH im Medium	128
5.6.1 Einführung: Die Stabilisierung des intrazellulären pH	128
5.6.2 Der intrazelluläre pH	130
5.6.3 Der Phosphatstoffwechsel	132
5.6.4 Das polyP-Signal bei alkalischem pH	135
5.6.5 Die Wirkung von NH_4Cl und Entkopplern	137
5.6.6. Diskussion: Der Leistungsbedarf der pH-Stabilisierung	140
5.6.6.1 Einleitung: Die Notwendigkeit von Stabilisierungs- mechanismen	140
5.6.6.2 Der Protonen- und Hydroxylionen-Transport durch die Plasmamembran	141
5.6.6.3 Die pH-Stabilisierung durch Puffer	146
5.6.6.4 Der Leistungsbedarf von Pumpsystemen	147
5.6.6.5 Die Steuerung der pH-Stabilisierung: Eine offene Frage	152
 6. Untersuchungen zur Lokalisation und Struktur von Polyphosphat in <i>Platymonas</i>	 154
6.1 Einleitung: Ergebnisse von biochemischen und NMR- spektroskopischen Untersuchungen an polyP in Mikro- organismen	154
6.2 Untersuchungen zur Lokalisation von polyP und zur Wirkung von Polyphosphatasen	155
6.3. Untersuchungen zur Struktur von zellulärem polyP	159
6.3.1 Untersuchungen an Zellextrakten	159
6.3.2 Untersuchungen an künstlichen Polyphosphaten	163
6.3.3 Deutung der Meßergebnisse	167
 7. Anwendung der ^{23}Na -Spektroskopie auf <i>Platymonas</i>	 171
7.1 Einführung: ^{23}Na in vivo-Spektroskopie seit Einführung der Verschiebungsreagenzien	171
7.2 Die Linienform der Resonanzen von Kernen mit $I = 3/2$	172
7.3. Verschiebungsreagenzien	174
7.3.1 Die Wirkungsweise von dysprosiumhaltigen Verschie- bungsreagenzien	174
7.3.2 Herstellung und Eigenschaften von DyTP_2	176
7.3.3 Herstellung und Eigenschaften von DyTTHA	178
7.4. Die Anwendungen von Verschiebungsreagenzien bei <i>Platymonas</i>	178
7.4.1 Messungen mit DyTP_2	178
7.4.2 Messungen mit DyTTHA	182
7.5 Diskussion: Ergebnisse und Aussichten der ^{23}Na - Spektroskopie an marinen Algen	185
 8. Zusammenfassung der Ergebnisse	 189

	Seite
Literatur	191
Anhang	
Die Berechnung von R_m	201
Die Abschätzung der Photosyntheserate im NMR-Röhrchen	204
Das Spektrum des Polyphosphates	208
Titrationen	213

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AEC	Energieinhalt des Adenylatsystems (adenylate energy charge)
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
ASP	Seewassermedium nach Provasoli (artificial seawater Provasoli)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenyl-hydrazon
CSA	Anisotropie der chemischen Verschiebung (chemical shift anisotropy)
CW	"Continuous Wave" (= Kontinuierliche Anregung des Spinsystems in NMR-Spektrometern)
CoA	Coenzym A
dG6P	deoxy-Glukose-6-Phosphat
DMO	5,5-Dimethyl-2,4-Oxazolidindion
DNP	2,4-Dinitrophenol
DyTP ₂	Dysprosium-Tripolyphosphatkomplex
DyTTHA	Dysprosium-TTHA-Komplex
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
FbP(α)	Fruktose-1,6-bis-Phosphat (α-Anomer)
FbP(β)	Fruktose-1,6-bis-Phosphat (β-Anomer)
F1,6bP	Fruktose-1,6-bis-Phosphat (= FbP)
FID	Freier Induktions-Zerfall (free induction decay)
F1P	Fruktose-1-Phosphat
F6P	Fruktose-6-Phosphat
FT	Fourier-Transformation
Gal1P	Galaktose-1-Phosphat
Gal6P	Galaktose-6-Phosphat
GA3P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
Gly1P	Glycerin-1-Phosphat
Gly2P	Glycerin-2-Phosphat
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-Sulfonsäure
IMP	Inosinsäure
MalP	Mannose-1-Phosphat
Ma6P	Mannose-6-Phosphat
MDP	Methylendiphosphonat
Mt1P	Mannit-1-Phosphat



NAD ⁺	Nikotinadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotinadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nikotinadenindinukleotid-Phosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nikotinadenindinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
PArg	Phosphoarginin
PCA	Perchlorsäure (perchlorate acid)
PCh	Phosphorylcholin
PCr	Phosphokreatin
PCV	Gepacktes Zellvolumen (packed cell volume)
PD	Phosphodiester
PEP	Phosphoenolpyruvat
2PG	1-Phospho-Glycerat
3PG	3-Phospho-Glycerat
pH _{cyt}	Cytoplasmatischer pH-Wert
pH _{ext}	Extrazellulärer pH-Wert
pH _{int}	Intrazellulärer pH-Wert
P _i	Anorganisches Phosphat (inorganic phosphate)
PME	Phosphomonoester
PP _i	(Anorganisches) Pyrophosphat (inorganic pyrophosphate)
polyP	Polyphosphat
PP-1	Terminales Phosphatmonomer von polyP
PP-2	Präterminales Phosphatmonomer von polyP (2. Phosphatmonomer)
PP-3	Präterminales Phosphatmonomer von polyP (3. Phosphatmonomer)
PP-4	Mittlere Phosphatmonomere von polyP
ppm	parts per million
Rib5P	Ribose-5-Phosphat
SP	Zuckerphosphate (sugar phosphates)
TCA	Trichloressigsäure
TP _i	Anorganisches Triphosphat
TTHA	Triethylentetraaminhexaessigsäure
UDPG	Uridindiphosphatglukose
XMP	Xanthylsäure (Xanthosin-5'-Phosphat)

1. Einleitung

Gegenstand und Gliederung der Arbeit

Die Kernspinresonanz-Spektroskopie (oder NMR-Spektroskopie; NMR = nuclear magnetic resonance) eröffnet als nichtinvasive Methode grundsätzlich die Möglichkeit, lebende Organismen zu untersuchen, ohne in sie störend oder gar zerstörend einzugreifen.

Die physikalisch begründet relativ geringe Empfindlichkeit der Meßmethode verhinderte zunächst ihre Anwendung auf biologische Proben. Erst die Entwicklung von Spektrometern mit hoher Empfindlichkeit ermöglicht seit Mitte der siebziger Jahre die Verwendung dieser Methode zur Klärung biologischer oder medizinischer Fragestellungen. Weiterhin bestehen aber spezielle Anforderungen an das Untersuchungsmaterial bezüglich Homogenität der magnetischen Eigenschaften und Konzentration des zu messenden biologischen Materials, welche die Anwendung der in vivo-NMR-Spektroskopie unter natürlichen Bedingungen auf besonders geeignete Proben und Fragestellungen beschränken.

An intakten Organismen sind vor allem Spektren des Kernes ^{31}P aufgenommen worden. Der Phosphatstoffwechsel ist sowohl im Gewebe als auch an Zellsuspensionen untersucht worden. Insbesondere werden ^{31}P -spektroskopische Untersuchungen auch zur pH-Bestimmung herangezogen (Überblicke geben beispielsweise Gadian et al. 1979, Roberts und Jardeztzy 1981, Gadian 1982, Bárány und Glonek 1984).

Verhältnismäßig neu ist die Untersuchung von Kationen mittels Kernspinresonanz unter in vivo-Bedingungen. Seit der Einführung von sogenannten Verschiebungsreagenzien gewinnt vor allem die ^{23}Na -NMR-Spektroskopie an Bedeutung (Literaturangaben finden sich in Kap. 7.1).

Während die Untersuchung intakter Gewebe vor allem die Frage nach Methoden aufwirft, die es erlauben, interessierende Gewebeteile gezielt zu spektroskopieren, ohne störende Signale benachbarter Gewebsregionen zu erhalten (orts aufgelöste Spektroskopie, topical NMR: Shaw 1983), stellt sich dieses Problem bei Proben homogen verteilter einzelliger Organismen nicht. Hier werden Fragestellungen des zellulären Stoffwechsels untersucht. Voraussetzung für derartige in vivo-Messungen ist,

daß die Versorgung der Zellen, daß heißt die Aufrechterhaltung eines stabilen Stoffwechselzustandes, während der Dauer der Messung gewährleistet ist.

Neben einer Reihe von Bakterien sowie Suspensionen tierischer und menschlicher Zellen aus Kulturen sind erst wenige Zellsysteme grüner Pflanzen untersucht worden, darunter Zellsysteme höherer Pflanzen (Roberts 1984, Foyer et al. 1982, Martin et al. 1982, Wray et al. 1985) sowie Algen wie *Chlorella* (Sianoudis 1986, Mitsumori und Ito 1984), *Nitellopsis obtusa* (Mimura und Kirino 1984) und *Scenedesmus* (Ruyters et al. 1985). Die geringe Zahl hat wohl auch darin ihren Grund, daß die Frage einer homogenen Belichtung während der Aufnahme von Spektren noch nicht vollständig zufriedenstellend gelöst ist.

Kaum Erfahrungen gibt es bisher mit NMR-spektroskopischen Untersuchungen an marinen Algen. Neben Messungen an der Alge *Heterosigma* (im wesentlichen Extraktmessungen: Watanabe et al. 1987) werden zur Zeit Messungen an *Dunaliella* durchgeführt (Gimmler et al. 1988, Ben-thal und Degani, persönliche Mitteilung).

In der vorliegenden Arbeit werden NMR-spektroskopische Verfahrenswesen anhand von Untersuchungen an einer in Seewasser lebenden Alge analysiert. Vorgestellt werden ^{31}P - und ^{23}Na -kernspinspektroskopische Untersuchungen an der Brackwasseralge *Platymonas subcordiformis*. Nach einer Darstellung der methodischen Voraussetzungen für die Aufnahme aussagefähiger Spektren unter den speziellen Bedingungen, die bei Messungen eurykaliner Algen in ihrem natürlichen Medium bestehen, werden ^{31}P -Spektren hinsichtlich ihrer Aussagen über den Energiestoffwechsel der Alge ausgewertet. Ein besonderer Schwerpunkt liegt auf der Untersuchung des intrazellulären pH unter variierenden Bedingungen. Die pH-Regulation der Alge bei unterschiedlichen Zuständen des Energiestoffwechsels wird diskutiert. Außerdem wird gezeigt, daß ^{23}Na -spektroskopische Untersuchungen auch unter Bedingungen erhöhter Salinität im Medium möglich sind, so daß sich NMR als geeignete Methode zur Bestimmung intrazellulärer Na^+ -Konzentrationen auch in intakten marinen Mikroorganismen anbietet.

In dem auf diese Einleitung folgenden 2. Kapitel werden die physikalischen Grundlagen der Kernspinresonanzspektroskopie dargestellt.

Das 3. Kapitel ist eine Einführung in den Stoffwechsel der Klasse von Organismen, zu der auch die in dieser Arbeit untersuchte Alge *Platymonas subcordiformis* gehört.

Im 4. Kapitel wird aufgeführt, welche Informationen die ^{31}P -NMR-Spektroskopie an lebenden Zellen liefern kann. Die besonderen Schwierigkeiten, die durch eine hohe Salinität des Mediums (Seewasser) entstehen, werden analysiert. Die Voraussetzungen für eine fehlerfreie Auswertung gemessener Spektren werden herausgearbeitet und Hinweise für die Interpretation von ^{31}P -NMR-Spektren gegeben. Die methodischen Hinweise dieses Kapitels sind teilweise auch auf die ^{23}Na -Spektroskopie übertragbar.

Das 5. Kapitel geht auf die ^{31}P -in vivo-spektroskopischen Untersuchungen an der Brackwasseralge *Platymonas subcordiformis* ein. Zunächst wird das Untersuchungsmaterial, die Versorgung der Zellen während der Aufnahme von Spektren sowie die Eichung der pH-Messung erläutert. Hieran anschließend werden die aufgenommenen Spektren analysiert. Diese Diskussion beachtet insbesondere den Einfluß unterschiedlicher Versorgungszustände auf die Zelle. Die Abhängigkeit des Phosphatstoffwechsels und des intrazellulären pH vom pH im Medium wird bei unterschiedlichen Energieversorgungszuständen gemessen. Ausgehend von den Meßergebnissen werden Überlegungen über die Energieabhängigkeit der pH-Regulation angestellt.

Das 6. Kapitel umfaßt Untersuchungen, die sich auf Polyphosphat beziehen, eine Verbindung, die eine Besonderheit der Mikroorganismen ist. Die Rolle des Polyphosphats im Stoffwechsel wirkt auch 100 Jahre nach der erstmaligen Auffindung von Polyphosphat in Hefe (Liebermann 1888) noch Fragen auf. Die Meßergebnisse werden in Hinblick auf die Lokalisation und die Struktur von polyP in *Platymonas* ausgewertet.

Das 7. Kapitel ist schließlich den ^{23}Na -spektroskopischen Untersuchungen an *Platymonas* unter Verwendung von Verschiebungsreagenzien gewidmet.

Jedes behandelte Gebiet wird an geeigneter Stelle durch eine spezielle Einführung vorgestellt, in der auch der Stand der Forschung referiert wird.

2. Grundlagen der Kernspinresonanzspektroskopie

2.1. Theoretische Grundlagen

2.1.1. Das kernmagnetische Moment

2.1.1.1 Der Kernspin

Atomkerne besitzen einen Kernspin genannten Drehimpuls $\vec{I}$, der durch die Kernspinquantenzahl I charakterisiert wird. Er ergibt sich aus der Kombination der Spins und der Bahndrehimpulse der Nukleonen, die den Kern bilden, entsprechend dem jeweils anzuwendenden Kopplungsschema. Protonen und Neutronen haben einen Spin $1/2$. Da die Bahndrehimpulsquantenzahlen stets ganzzahlig sind, haben Kerne mit gerader Nukleonenzahl eine ganzzahlige, solche mit ungerader Nukleonenzahl eine halbzahlige Kernspinquantenzahl I .

Für den Betrag von $\vec{I}$ gilt

$$|\vec{I}| = \sqrt{I(I+1)} \quad . \quad (2.1)$$

Gleichzeitig mit $\vec{I}^2$ beziehungsweise dem Betrag von $\vec{I}$ ist eine räumliche Komponente des Kernspins, I_z , beobachtbar, die insgesamt $2I+1$ Werte annehmen kann. Für sie gilt

$$I_z = \hbar m \quad (2.2)$$

wobei $m = I, I-1, \dots, -I+1, -I$; damit ist $I_z^{\max} = \hbar I$.

2.1.1.2 Das gyromagnetische Verhältnis

Mit dem Kernspin $\vec{I}$ eines positiv geladenen Atomkernes ist ein magnetisches Dipolmoment $\vec{\mu}$ verbunden:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad . \quad (2.3)$$

Der Proportionalitätsfaktor γ ist das (absolute) gyromagnetische Verhältnis. Es läßt sich als Produkt zweier Faktoren γ_K und g schreiben. Die Konstante γ_K entspricht dem klassisch berechneten magnetischen Dipol-

moment für ein Teilchen der Ladung $-e$ und der Protonenmasse m_p , das heißt dem Kernmagneton, pro Einheit des Drehimpulses

$$\gamma_K = \frac{\mu_K}{\hbar} = \frac{e}{2m_p} = 4,7894 \cdot 10^{-7} \frac{\text{As}}{\text{kg}} \quad (2.4)$$

Der dimensionslose Faktor g wird ebenfalls als (relatives) gyromagnetisches Verhältnis oder einfach als g -Faktor bezeichnet. Für den Spin eines Protons gilt $g_{s,p} = 5,5856$, für seinen Bahndrehimpuls ist $g_{e,p} = 1$. Für ein Neutron sind die entsprechenden Größen $g_{s,n} = -3,8263$ und $g_{e,n} = 0$. Bei Kernen, die aus mehreren Nukleonen aufgebaut sind, hängt der resultierende g -Faktor von der Kopplung der Spins und der Bahndrehimpulse zum Gesamtdrehimpuls ab. g - und damit γ - sind daher für einen gegebenen Atomkern spezifische Größen.

2.1.1.3 Die Besetzung von Energieniveaus

Die Energie eines magnetischen Moments $\vec{\mu}$ im Magnetfeld $\vec{B}$ wird durch einen einfachen Zeeman-Hamiltonoperator beschrieben:

$$\hat{H} = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (2.5)$$

Wenn das äußere Feld die Größe B_0 und die Richtung der z -Achse definiert, ist die z -Komponente des magnetischen Momentes von Interesse, für die nach Gleichung (2.3) gilt:

$$\mu_z = \gamma \hat{I}_z \quad (2.6)$$

$\hat{I}_z$ ist der Operator für die z -Komponente des Kernspins mit den in Gleichung (2.2) angegebenen Eigenwerten. Für den Hamiltonoperator gilt

$$\hat{H} = -\gamma B_0 \hat{I}_z \quad (2.7)$$

und er besitzt die Energieeigenwerte

$$E_m = -\gamma \hbar B_0 m \quad m = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \dots, \frac{1}{2}, -\frac{1}{2}, \dots, -\frac{1}{2}$$

Der Kern mit Spin $\frac{1}{2}$ kann demnach im äußeren statischen Magnetfeld $2(1/2)$ äquidistante diskrete Energiezustände annehmen, die voneinander den Abstand $E = \gamma \hbar B_0 = \hbar \omega_L$ haben. ω_L ist die Larmorfrequenz eines

Kernes im Magnetfeld B_0 , die von γ abgehängt und daher wie γ bei festem B_0 für einen Kern spezifisch ist.

In einer makroskopischen Probe befindet sich eine große Zahl von Kernen, deren Spins im thermischen Gleichgewicht entsprechend der Boltzmannverteilung auf die Energieniveaus verteilt sind:

$$\frac{n_{m^+}}{n_{m^-}} = \exp\left(\frac{-\gamma \hbar B_0}{kT}\right) \approx 1 + \left(\frac{-\gamma \hbar B_0}{kT}\right) \quad (2.8)$$

(T : absolute Temperatur; k : Boltzmannkonstante; n_v : Zahl der Kerne im Zustand v , $m^+ \hat{=}$ Zustand höherer Energie, $m^- \hat{=}$ Zustand niedrigerer Energie).

Bei einem positiven gyromagnetischen Verhältnis - das die meisten Kerne haben - ist der Zustand mit niedrigerer Energie derjenige, bei dem der Kernspin parallel zum äußeren Feld steht.

2.1.1.4 Die Einstellung eines thermischen Gleichgewichtes

Durch Einstrahlung eines magnetischen Wechselfeldes B_1 mit der Frequenz ω_L orthogonal zur z-Achse werden Übergänge aus dem Zustand m^- in den Zustand höherer Energie m^+ induziert, wobei Quanten $\hbar\omega_L$ aus dem Wechselfeld absorbiert werden. Aus dem nunmehr überbesetzten Zustand m^+ kehren Kerne unter Emission von Quanten in den Zustand m^- zurück. Emission und Absorption von Quanten wird durch Wechselwirkung mit äußeren Feldern induziert. Solange der Zustand höherer Energie überbesetzt ist, findet eine Nettoemission statt, die bei der Kernspinspektroskopie registriert wird.

Die Rückkehr zum thermischen Gleichgewicht wird im wesentlichen durch nicht strahlende Übergänge vermittelt, die den Energieausgleich mit der Umgebung des Kernes herbeiführen. Diese Umgebung wird in der Resonanzspektroskopie auch in Flüssigkeiten oder Gasen als Gitter bezeichnet, so daß die Einstellung des Gleichgewichts "Spin-Gitter-Relaxation" genannt wird. Sie verläuft als abklingende Exponentialfunktion mit der Zeitkonstante T_1 - auch als "longitudinale Relaxationszeit" bezeichnet.

Die ermittelten Quanten können nur detektiert werden, wenn die Emission kohärent stattfindet. Die Kohärenz geht durch einen als "Spin-Spin-Relaxation" oder "transversale Relaxation" bezeichneten Vorgang verloren, der durch eine Zeitkonstante $T_2 \leq T_1$ gekennzeichnet wird.

Beide Relaxationsmechanismen werden durch in Frequenz und Amplitude fluktuierende Felder am Ort der Kerne vermittelt, die zum Beispiel durch Dipolmomente sich bewegender benachbarter Atome oder Moleküle hervorgerufen werden.

2.1.2. Das kernmagnetische Moment im äußeren Magnetfeld

2.1.2.1 Die Bloch'schen Gleichungen

Anschaulich läßt sich das Kernspinresonanzexperiment am besten darstellen, wenn die Bewegung der makroskopischen magnetischen Momente der Probe im äußeren Magnetfeld klassisch betrachtet wird. Sie wird durch einen Satz gekoppelter phänomenologischer Differentialgleichungen, die Bloch'schen Gleichungen, beschrieben. Sie sollen im folgenden für die Resonanzspektroskopie mit Pulsanregung dargestellt werden (FT-Spektroskopie).

Im Gegensatz zur CW-Spektroskopie (Spektroskopie mit kontinuierlicher Anregung = Continuous Wave Spectroscopy) können hierbei die Anregungen des Spinsystems durch einen Puls endlicher Länge und die nachfolgende Präzession des magnetischen Momentes im äußeren Magnetfeld B_0 getrennt behandelt werden. Die Lösungen der Bloch'schen Gleichungen für das CW-Experiment (dargestellt als Funktion der Anregungsfrequenz) sind den Lösungen für das Puls-Experiment äquivalent, wenn sie in den Frequenzraum transformiert werden. (Dabei wird angenommen, daß einerseits beim CW-Experiment die Anregung des Spinsystems mit einem schwachen B_1 -Feld erfolgt, so daß Sättigungseffekte ausgeschlossen sind, und daß andererseits die Länge des Pulses im FT-Experiment klein gegen alle übrigen im System enthaltenen Zeitkonstanten ist.)

Die Äquivalenz von quantenmechanischer und klassischer Darstellung beruht auf der Tatsache, daß sich der Erwartungswert des kernmagnetischen Momentes wie ein klassisches Moment verhält (Herleitung siehe

z.B. Slichter 1980 (Kap. 2)). Im Magnetfeld gilt

$$\frac{\partial \langle \vec{\mu} \rangle}{\partial t} = \langle \vec{\mu} \rangle \cdot \gamma \vec{B} \quad . \quad (2.9)$$

Diese Gleichung gilt auch für zeitabhängige Felder. Sie beschreibt die Präzessionsbewegung des Erwartungswertes um eine durch die Richtung des Feldes definierte Achse mit der Larmorfrequenz $\vec{\omega} = \gamma \vec{B}$.

Im Experiment werden n gleichartige Spins betrachtet, die zusammen das magnetische Moment der Probe bilden:

$$\vec{M} = \sum_i^n \langle \vec{\mu}_i \rangle \quad . \quad (2.10)$$

Da die x- und y-Komponenten der $\langle \vec{\mu}_i \rangle$ um die Achse von $\vec{B}$ gleichverteilt sind, ist das resultierende $\vec{M}$ parallel zu $\vec{B}$ mit dem Betrag

$$|\vec{M}| = M_0 = n \frac{\gamma \hbar I (I + 1)}{3 kT} \cdot |\vec{B}| \quad . \quad (2.11)$$

Es gilt dann

$$\frac{\partial}{\partial t} \vec{M} = \gamma \vec{M} \times \vec{B} \quad . \quad (2.12)$$

Während der Einstrahlung eines Wechselfeldes setzt sich $\vec{B}$ zusammen aus dem statischen äußeren Feld $\vec{B}_0$ in z-Richtung und einem mit der Frequenz ω in der xy-Ebene rotierenden Feld B_1 mit den Komponenten $B_x = B_1 \cos \omega t$ und $B_y = -B_1 \sin \omega t$.

Bei Berücksichtigung der bereits erwähnten Relaxationsprozesse, die für die einzelnen Komponenten von $\vec{M}$ beschrieben werden durch

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t} M_x &= -\frac{1}{T_2} M_x \\ \frac{\partial}{\partial t} M_y &= -\frac{1}{T_2} M_y \\ \frac{\partial}{\partial t} M_z &= -\frac{1}{T_1} (M_z - M_0) \end{aligned} \quad (2.13)$$

erhält man aus Gleichung (2.12) die Bloch'schen Gleichungen im festen Koordinatensystem:

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t} M_x &= \gamma (M_y B_0 + M_z B_1 \sin \omega t) - \frac{1}{T_2} \\ \frac{\partial}{\partial t} M_y &= \gamma (M_z B_1 \cos \omega t - M_x B_0) - \frac{1}{T_2} \\ \frac{\partial}{\partial t} M_z &= \gamma (M_x B_1 \sin \omega t + M_y B_1 \cos \omega t) - \frac{M_z - M_0}{T_1} . \end{aligned} \quad (2.14)$$

Diese Gleichungen werden anschaulicher, wenn sie in ein Koordinatensystem (x', y', z') transformiert werden, das mit der Frequenz ω um die z -Achse rotiert, so daß $\vec{B}_1$ in diesem System entlang der x' -Achse fixiert ist.

Man erhält dann die Bloch'schen Gleichungen im rotierenden System, wobei $\gamma B_0 = \omega_L$ gesetzt ist:

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t} u &= (\omega_L - \omega) v - \frac{u}{T_2} \\ \frac{\partial}{\partial t} v &= -(\omega_L - \omega) u + B_1 M_z - \frac{v}{T_2} \\ \frac{\partial}{\partial t} M_z &= -\gamma B_1 v - \frac{M_z - M_0}{T_1} \end{aligned} \quad (2.15)$$

u und v entsprechen den Komponenten des magnetischen Momentes, die entlang den x' - und y' -Achsen im rotierenden System gerichtet sind.

Für den Zusammenhang zwischen M_x und M_y im festen sowie u und v im rotierenden System gilt:

$$\begin{aligned} M_x &= u \cos \omega t - v \sin \omega t & M_y &= u \sin \omega t + v \cos \omega t \\ u &= M_x \cos \omega t + M_y \sin \omega t & v &= -M_x \sin \omega t + M_y \cos \omega t . \end{aligned} \quad (2.16)$$

Analog zu Gleichung (2.12) läßt sich Gleichung (2.15) auch als Vektorgleichung schreiben:

$$\frac{\partial}{\partial t} \vec{M}_{\text{rot}} = \gamma \vec{M}_{\text{rot}} \times \vec{B}_{\text{eff}} . \quad (2.17)$$

Das im rotierenden System wirkende effektive Feld $\vec{B}_{\text{eff}}$ setzt sich zusammen aus $\vec{B}_1$ sowie $\vec{B}_0$ und einem fiktiven Feld $\frac{\vec{\omega}}{\gamma}$, das als Folge der Rotation des Koordinatensystems auftritt. Wenn die Frequenz, mit der das Koordinatensystem (x' , y' , z') rotiert und mit der das Wechselfeld $\vec{B}_1$ eingestrahlt wird, genau der Larmorfrequenz des Kernspins $\omega_L = \gamma B_0$ entspricht, heben sich $\vec{B}_0$ und $\frac{\vec{\omega}}{\gamma}$ gerade auf. Einziger Beitrag zu $\vec{B}_{\text{eff}}$ ist dann das Feld $\vec{B}_1$ (ortsfest im rotierenden System entlang der x' -Achse).

2.1.2.2 Das magnetische Moment nach einem Puls

Das magnetische Moment wird unter diesen Bedingungen in der $y'z'$ -Ebene um das Feld $\vec{B}_1$ gedreht.

Der Drehwinkel δ wird durch die Dauer t_p , während der das Feld $\vec{B}_1$ wirkt, das heißt durch die Einstrahlungsdauer des Wechselfeldes bestimmt:

$$\delta = \gamma B_1 t_p \quad . \quad (2.18)$$

Bei einem "90°-Puls" wirkt B_1 solange, daß $\vec{M}$ aus der z -Richtung gerade um 90° in die Richtung von y' gedreht wird, so daß $v = |\vec{M}|$. Wegen ω_L klingt die Komponente v nach Gleichung (2.15) exponentiell mit der Zeitkonstante T_2 ab.

Bezüglich einer ortsfesten Spule in der xy -Ebene rotiert $\vec{M}$ mit der Frequenz ω_L und induziert in ihr eine Wechselspannung. Diese wird verstärkt und mit der Einstrahlungsfrequenz ω von B_1 gemischt, so daß ein Spannungssignal proportional zu $v(t)$ registriert wird.

Momente von Kernen, deren Larmorfrequenzen ω_L , etwas von ω abweichen, rotieren in der $x'y'$ -Ebene mit der Frequenz $\omega - \omega_L$. $v(t)$ ist in diesem Fall eine gedämpfte harmonische Schwingung, die wiederum mit T_2 abklingt. Das abklingende Signal nach einem Puls wird als "Freier Induktionszerfall" beziehungsweise FID (von Free Induction Decay) bezeichnet.

Wenn außer der Komponente v von $\vec{M}$ auch die orthogonale Komponente u gemessen wird, läßt sich das registrierte Signal als komplexe Funktion der Zeit schreiben:

$$G(t) = u(t) + iv(t) = M_y^+ \sin(\omega - \omega_L)t e^{-t/T_2} + i M_y^+ \cos(\omega - \omega_L)t e^{-t/T_2} \quad (2.19)$$

M_y^+ entspricht $v(t=0)$, das bei Pulswinkeln von weniger als 90° kleiner als $|\vec{M}|$ ist. Gleichung (2.19) löst die Differentialgleichungen (2.15) für die Komponenten u und v , die bei $B_1 = 0$, das heißt nach dem Abschalten des B_1 -Pulses, von der dritten Komponenten M_z entkoppelt sind.

2.1.2.3 Die Fourier-Transformation

Durch Fourier-Transformation wird $G(t)$ in seine Frequenzanteile zerlegt:

$$F(\omega) = \int_0^\infty G(t) e^{-i\omega t} dt \quad (2.20)$$

Die untere Grenze liegt bei 0 und nicht bei $-\infty$, da $G(t)$ vor dem Puls 0 ist. Die Lösung hat eine reelle und eine imaginäre Komponente. Letztere liefert das Absorptionssignal

$$F_{im}(\omega) = M_y^+ \frac{T_2^*}{1 + (T_2^*)^2 (\omega - \omega_L)^2} \quad (2.21)$$

das üblicherweise als NMR-Spektrum dargestellt wird (T_2^* enthält neben der reinen transversalen Relaxation auch Linienverbreiterungen durch Inhomogenitäten von B_0 im Probenvolumen. Feldinhomogenitäten lassen die Momente identischer Kerne mit etwas unterschiedlichen Frequenzen rotieren, so daß die Phasenkohärenz schneller verloren geht, als wenn die durch T_2 charakterisierte transversale Relaxation allein wirken würde).

Das Absorptionssignal stellt eine Lorentzlinie mit dem Maximum bei ω_L und der Halbwertsbreite $(\pi T_2^*)^{-1}$ dar. Wie leicht zu zeigen ist, hängt das Integral über die Lorentzlinie nur von der Höhe des FID zur Zeit $t=0$

ab, ist also - unabhängig von T_2^* - proportional zu M_y^+ beziehungsweise zu M_0 . - Die reelle Komponente von $F(\omega)$ zeigt das korrespondierende Dispersionssignal.

Durch einen Puls endlicher Länge werden nicht nur die Kerne angeregt, deren Larmorfrequenz ω_L genau der Einstrahlungsfrequenz ω entspricht, sondern alle Kerne mit Larmorfrequenzen in einem Frequenzintervall $\Delta\omega$, das umgekehrt proportional zur Länge des Pulses ist. Die Anregung von Kernen mit unterschiedlichen Frequenzen führt zu einem komplexen Induktionssignal, in dem mehrere abklingende harmonische Schwingungen einander überlagern. Die verschiedenen Frequenzen müssen durch Fourier-Transformation mit Hilfe eines Rechners ermittelt werden.

2.1.3 Die chemische Verschiebung

Die genaue Resonanzfrequenz eines Kernes hängt vom Magnetfeld am Kernort ab, das im allgemeinen vom angelegten Feld $\vec{B}_0$ abweicht. Deshalb können in einer Probe Kerne vorhanden sein, die bei etwas unterschiedlichen Frequenzen resonieren, obwohl sie zur selben Isotopenart gehören und identische γ besitzen. Ein Kern ist von einer Elektronenhülle umgeben, deren Form und Dichte von der chemischen Bindung abhängen, die das Atom eingegangen ist. Die Elektronenhülle verändert durch Abschirmung oder Verstärkung das tatsächliche Feld am Kernort, so daß der Hamiltonoperator aus Gleichung (2.5) genauer beschrieben wird durch

$$\hat{H} = -\gamma \vec{B}_0 \cdot \vec{I} - \gamma \vec{I} \cdot \vec{\sigma} \cdot \vec{B}_0 \quad (2.22)$$

$\vec{\sigma}$ ist ein Tensor 2. Stufe, der als "Tensor der chemischen Verschiebung" (Chemical Shift Tensor) bezeichnet wird. Er gibt die richtungsabhängige lokale Entmagnetisierung an.

Kleine Moleküle in Flüssigkeiten bewegen sich üblicherweise so schnell (durch Rotation und Translation), daß die durch Differenzen der lokalen Entmagnetisierungen für die verschiedenen Molekülachsen hervorgerufenen Unterschiede der Resonanzfrequenzen kleiner sind als die "Frequenz" der Molekülbewegungen. Es ergibt sich eine isotrope mittlere Entmagnetisierung, so daß gilt

$$\hat{H} = -\gamma B_0 (1 - \sigma) I_z \quad (2.23)$$

mit $\sigma = \frac{1}{3} \text{Sp}(\vec{\sigma})$.

Die Präzessionsfrequenz ω_L eines in einem Molekül befindlichen Kernes ist damit auch von seiner chemischen Umgebung abhängig und deshalb bei gegebenem äußeren Magnetfeld eine spezifische Größe für bestimmte Verbindungen. Um diese verbindungsspezifische Größe feldunabhängig darzustellen, wird die Frequenzangabe bei der Darstellung der Spektren ersetzt durch die Angabe einer relativen Frequenz, die auf eine willkürlich gewählte Frequenz in der Nähe der Einstrahlfrequenz bezogen wird:

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{\text{ref}}}{\omega_{\text{ref}}} \approx \sigma_{\text{ref}} - \sigma \quad . \quad (2.24)$$

δ bezeichnet die relative lokale Entmagnetisierung. In der englischsprachigen Literatur wird δ allgemein als "Chemical Shift" bezeichnet, was manchmal als "chemische Verschiebung" in das Deutsche übertragen wird. δ wird als Vielfaches von 10^{-6} ($\hat{=}$ parts per million, ppm) angegeben. Als Referenzsubstanz dient bei der ^{31}P -Spektroskopie meist 85 %-ige Phosphorsäure. Aufgrund der makroskopischen Entmagnetisierung durch die Probe, die von der Orientierung der Probe zum Feld abhängt, unterscheiden sich die absoluten Referenzfrequenzen in Spektrometern, die mit resistiven oder mit supraleitenden Magneten betrieben werden.

2.1.4 Spin-Spin-Kopplung

Viele NMR-Signale weisen eine Feinstruktur auf. Ursache dafür ist die Wechselwirkung zwischen dem beobachteten Kernspin und dem Kernspin eines anderen Kernes der gleichen Art (homonukleare Kopplung) oder dem Kernspin eines anderen Isotops (heteronukleare Kopplung). Da in Flüssigkeiten durch schnelle Bewegung Anisotropien ausgemittelt werden, verursacht nur der isotrope Anteil der sogenannten skalaren Kopplung eine Aufspaltung der Linien. Die skalare Kopplung, die über Elektronen kovalenter Bindungen vermittelt wird, bewirkt eine Aufspaltung der Energieniveaus der beteiligten Spins. Der Abstand der Niveaus hängt ab von der Art und Anzahl der dazwischen liegenden Bindungen, dem Bindungswinkel und der Orientierung der Spins relativ zueinander und wird durch die skalare Kopplungskonstante A beschrieben. Der Hamil-

tonoperator für die Energiedifferenz der Niveaus lautet

$$\hat{H}_{I_1 I_2} = \hbar^{-1} A \hat{I}_1 \cdot \hat{I}_2 \quad . \quad (2.25)$$

Wenn der Abstand der Larmorfrequenzen zweier koppelnder Kerne groß gegen die Kopplungskonstante ist, spalten die Resonanzlinien auf entsprechend

$$\begin{aligned} \omega_1 &= \gamma_1 (1 - \sigma_1) B_0 \pm \frac{1}{2} m_2 A, & m_2 &= I_2, I_2-1, \dots -I_2 \\ \omega_2 &= \gamma_2 (1 - \sigma_2) B_0 \pm \frac{1}{2} m_1 A, & m_1 &= I_1, I_1-1, \dots -I_1 \end{aligned} \quad (2.26)$$

Zu beobachten ist ein sogenanntes Spektrum erster Ordnung.

Wenn die Differenz der Frequenzen in der Größenordnung von A liegt, erhält man Spektren zweiter Ordnung, bei denen die relativen Linienintensitäten vom Abstand der koppelnden Kerne im Spektrum abhängen.

Wenn die koppelnden Kerne magnetisch äquivalent und ihre Larmorfrequenzen gleich sind, ist keine Aufspaltung beobachtbar.

2.1.5 Relaxationsmechanismen

Die Relaxationsvorgänge werden dadurch verursacht, daß die magnetischen Momente, die mit den beobachteten Spins verbunden sind, mit ihrer Umgebung wechselwirken. Auf die Spins wirken stochastisch fluktuierende lokale Drehmomente, die durch fluktuierende mikroskopische Magnetfelder hervorgerufen werden.

Diese lokalen Felder werden von in der Probe vorhandenen Molekülen verursacht. Zum Beispiel kann die lokale Entmagnetisierung, die ein Kern durch das ihn enthaltende Molekül erfährt, als lokales Abschirmfeld beschrieben werden. Benachbarte Moleküle mit einem magnetischen Moment rufen Dipolfelder hervor. Die Felder fluktuieren, da die Moleküle sich in der Probe bewegen. Die Bewegung läßt sich charakterisieren durch eine Korrelationszeit τ_c , die zum Beispiel als "mittlere" Zeit zwischen zwei Stößen angesehen werden kann, durch die ein Molekül seinen Bewegungszustand ändert.

In wässrigen Lösungen niedriger Viskosität ist τ_c sehr kurz ($\leq 10^{-10}$ s), so daß die Bewegungen Frequenzanteile zwischen 0 und 10^{10} Hz enthalten. Mit steigender Viskosität wird τ_c länger, die Frequenzverteilung wird schmaler, und der relative Anteil niedrigerer Frequenzen wächst.

Wenn die mit Molekülbewegungen fluktuierenden mikroskopischen Felder $b^{\rightarrow}$ durch eine isotrope Korrelationszeit charakterisiert werden können, die für alle räumlichen Komponenten $b_x, b_y, b_z = b_g$ gleich ist, so daß

$$\overline{b_g(t) b_g(t+\tau)} = b_g^2 e^{-\tau/\tau_c}, \quad (2.27)$$

ergibt sich für T_1 und T_2 (siehe z.B. Slichter 1980 (Kap. 5)):

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} &= \gamma^2 (\overline{b_x^2} + \overline{b_y^2}) \frac{\tau_c}{(1 + \omega_L^2 \tau_c^2)} \\ \frac{1}{T_2} &= \gamma^2 \overline{b_z^2} \tau_c + \gamma^2 \overline{b_y^2} \frac{\tau_c}{(1 + \omega_L^2 \tau_c^2)} \end{aligned} \quad (2.28)$$

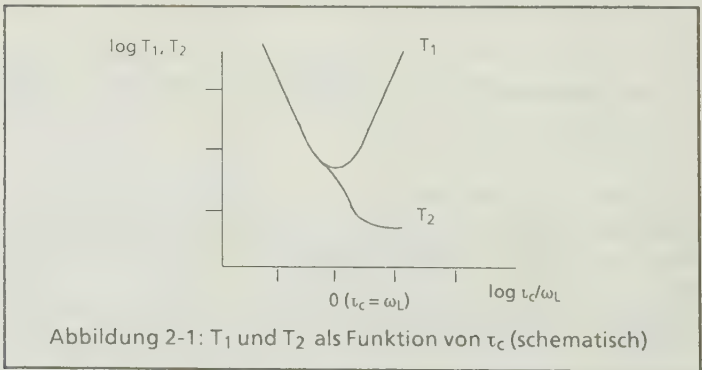
für die Relaxation eines magnetischen Momentes, das im rotierenden System parallel zur x-Achse liegt.

Für große τ_c , das heißt wenn $\tau_c \omega_L \gg 1$ in viskosen Medien, wird T_1 sehr lang; dasselbe gilt für kleine τ_c . Am schnellsten erfolgt die Relaxation bei $\tau_c \sim \frac{1}{\omega_L}$. Darin spiegelt sich die Tatsache wieder, daß die longitudinale Relaxation die Rückkehr des aus dem thermischen Gleichgewicht ausgelenkten Spinsystems in seine Gleichgewichtslage beschreibt. Sie erfolgt durch Dissipation von Energie aus dem Spinsystem in die Umgebung, ist also mit dem Transport von Energiequanten $\hbar \omega_L$ verbunden. Deshalb ist die Relaxation am effektivsten bei Feldern, die einen großen Anteil von Bewegungen mit der Frequenz $\omega_L = \frac{1}{\tau_c}$ besitzen.

Da die T_1 -Relaxation makroskopisch mit einer Drehung von Momenten aus der xy-Ebene zur z-Achse verbunden ist, tragen zu ihr nur Komponenten von $b^{\rightarrow}$ senkrecht zur z-Achse bei.

Die transversale T_2 -Relaxation beschreibt die Abnahme des registrierbaren magnetischen Momentes in der xy-Ebene. Zum einen ist dies eine

Folge der longitudinalen Relaxation. Zum anderen beruht sie auf einer Dephasierung der einzelnen Spins. - Dephasierung der Spins ist die klassische Veranschaulichung des Verlustes an Kohärenz bei der Emission von Quanten $\hbar\omega_L$ durch das Spinsystem: Die magnetischen Momente der einzelnen Kerne, deren vektorielle Summe das registrierbare magnetische Moment der Probe darstellt, rotieren in der xy-Ebene mit variierenden, etwas unterschiedlichen Winkelgeschwindigkeiten. Der Winkel zwischen den einzelnen Momenten vergrößert sich, ihre Vektorsumme wird kleiner. - Dabei wird die Entropie des Systems erhöht, während die Energieveränderungen minimal sind. Deshalb wird die transversale Relaxation zusätzlich von Feldkomponenten b_z in z-Richtung verursacht, die mit sehr langen Korrelationszeiten fluktuieren. T_2 ist stets kleiner oder gleich T_1 . Wenn τ_c sehr klein ist, das heißt bei $\tau_c\omega_L \ll 1$, ist $T_1 \approx T_2$, wobei beide Zeiten lang sind. Die Linien im Spektrum sind dann recht schmal (extreme narrowing-Fall bzw. Bewegungsverschmälerung; siehe Abb. 2-1).



Die an den Kernorten wirkenden Felder $\vec{b}^+$ sind Ergebnisse verschiedener Wechselwirkungen, die unterschiedlich stark zur Relaxation beitragen. Die wichtigsten sind die Folgenden:

- Dipol-Dipol-Wechselwirkung:

Sie beschreibt die Wirkung des magnetischen Dipolmomentes benachbarter Kerne oder Atome auf einen Spin. Die damit verbundenen Relaxationsprozesse sind proportional zum gyromagnetischen Verhältnis

der beteiligten Partner und umgekehrt proportional zur dritten Potenz des Abstandes. Wegen des Abstandsgesetzes finden Wechselwirkungen mit anderen Kernspins außer bei Wasserstoff nur intramolekular statt. Paramagnetische Substanzen, die ein ungepaartes Elektron besitzen, wirken trotz eines größeren Abstandes als Relaxationszentren, da das gyromagnetische Verhältnis des Elektrons um drei Größenordnungen über dem des Kernes liegt. Sie sind deshalb sehr wirksame Relaxationsreagenzien.

- Anisotropie der relativen lokalen Entmagnetisierung (Chemical Shift Anisotropie, CSA):

Sie beschreibt Feldvariationen am Kernort, die durch die unterschiedliche Abschirmung des B_0 -Feldes bei unterschiedlichen Orientierungen des Moleküls zur B_0 -Achse hervorgerufen werden. Die Fluktuationen sind proportional zur äußeren Feldstärke, so daß in Proben mit einem hohen Anteil von CSA-Relaxation die durch eine Erhöhung des B_0 -Feldes vergrößerte Signalempfindlichkeit durch die zusätzliche Linienverbreiterung wieder aufgehoben wird.

- Quadrupol-Wechselwirkung:

Sie beschreibt die Wirkung elektrischer Feldgradienten am Kernort auf Kerne mit Quadrupolmoment. Bei diesen Kernen - zum Beispiel ^{23}Na - ist sie der wichtigste Relaxationsmechanismus.

- Wechselwirkung durch skalare Kopplung:

Relaxationsvorgänge, die einen Kopplungspartner betreffen, reduzieren über die skalare Kopplung auch die Lebensdauer von Energiezuständen des anderen Partners. Dasselbe gilt, wenn die Bindungen, die die Kopplung vermitteln, durch chemische Reaktionen beziehungsweise Austauschvorgänge verändert werden.

- Spin-Rotation-Wechselwirkung:

Sie beschreibt die Wirkungen magnetischer Momente, verursacht von Kreisbewegungen, die Elektronen um den beobachteten Kern ausführen. Diese werden durch Rotationen eines Moleküls oder Molekülteils erzeugt. Die Rotation wird durch eine Rotationskorrelationszeit τ_j beschrieben, deren Temperaturabhängigkeit von der von τ_c abweicht.

2.2 Die Elemente des Spektrometers

Die in dieser Arbeit dargestellten Messungen wurden mit hochauflösenden Fourier-Transformations-Kernspinspektrometern der Firma Bruker, Typ 360 WH und 360 AM, durchgeführt. Beide Geräte unterscheiden sich wesentlich nur im maximalen Durchmesser des Probenbehälters. Aufnahme sowie Darstellung und Auswertung der Spektren wurden durch das Bruker-Standardprogramm DISNMR unterstützt.

Wie in Abbildung 2-2 dargestellt, besteht das NMR-Spektrometer im wesentlichen aus drei Komponenten: dem Magneten mit dem Meßkopf, der Hochfrequenz-Sende- und Empfangs-Elektronik und dem Rechner, mit dem die Spektrenaufnahme gesteuert wird.

Der Magnet besteht aus einer heliumgekühlten supraleitenden Spule, die in einem Dewar eingeschlossen ist. Er erzeugt ein Feld, das in der Bohrung des Dewars homogen ist und parallel zur Bohrung liegt. Bei der erzielten Feldstärke $|\vec{B}_0|$ von 8,457 T haben Protonen die Larmorfrequenz von 360 MHz. ^{31}P wird bei 145,78 MHz gemessen, ^{23}Na bei 95,26 MHz.

Das Einbringen einer Probe in das Feld verändert den Verlauf der Feldlinien etwas, da stets Suszeptibilitätsgrenzen zwischen dem Probenmaterial und der umgebenden Luft bestehen. Durch Korrekturspulen (Shimspulen) muß das B_0 -Feld so beeinflusst werden, daß es im Probenvolumen homogen ist. Verbleibende Inhomogenitäten sollten kleiner sein als die durch Relaxation bedingten Linienbreiten. Bei in vivo-Proben sollte die Homogenität nicht schlechter als 0,1 ppm sein.

In die Bohrung des Magneten, also parallel zum Feld, werden der Meßkopf und die Probe eingeführt. Der Meßkopf enthält an der Stelle maximaler B_0 -Homogenität eine Spule, die die Probe umgibt. Sie dient sowohl als Sendespule für den Radiofrequenz-Puls, der einem rotierenden B_1 -Feld äquivalent ist, als auch als Empfangsspule für Radiofrequenz-Signale, die von in Resonanz befindlichen Kernen ausgesandt werden. Da das B_1 -Feld senkrecht auf $\vec{B}_0$ stehen muß, ist die Spule als Sattelspule (Helmholtz-Spule) ausgelegt.

Sie erzeugt ein B_1 -Feld, das im Inneren der Spule weitgehend homogen ist. Zum Radius der Spule hin - besonders in der Nähe der Spulendrähte -

ist er schwächer (Pelnar 1986, Hayes et al. 1985). Die Feldstärke nimmt auch schnell ab, wenn das von der Spule umfaßte Volumen entlang ihrer Achse verlassen wird (das heißt parallel zu B_0). Um die Homogenitätskorrektur (den "Shim") des B_0 -Feldes zu erleichtern, werden Probenröhrchen meist so mit Substanz gefüllt, daß die Probe oben und unten über die Spule hinausragt. Resonanzsignale werden aber nur von Spins empfangen, die sich im Bereich des homogenen B_1 -Feldes befinden, da die Sattelspule nur in diesem Teilvolumen hinreichend empfindlich ist. Dieser Bereich wird als "aktives Probenvolumen" bezeichnet.

Das Radiofrequenz-Signal zur Anregung des Spins wird im Hochfrequenz-Teil erzeugt. Die Anregungsfrequenz ω_0 wird über einen Verstärker und ein rechnergesteuertes Tor, das für die jeweils gewünschte Pulsdauer τ_p geöffnet ist, auf die Sattelspule geleitet. Nach einer kurzen Totzeit nach dem Schließen des Tores wird das von der Probe ausgehende Signal mit den Larmorfrequenzen ω_L , der FID, aufgenommen. Da die aufgenommene Leistung extrem gering ist, ist eine mehrstufige Verstärkung des Signals erforderlich. Unmittelbar am Magneten befindet sich ein Vorverstärker.

Im Empfangsteil wird das aufgenommene Frequenzsignal mit der Anregungsfrequenz gemischt, so daß bei der weiteren Verarbeitung, insbesondere bei der Digitalisierung des Spannungssignals im Analog-Digital-Umsetzer, nur noch die niedrigeren Differenzfrequenzen $\Delta\omega = \omega_L - \omega_0$ von Anregungsfrequenz und Resonanzsignalen behandelt werden müssen. (Aus Gründen der Flexibilität wird das Signal schon nach der Vorverstärkung zur Zwischenfrequenz gemischt.) Im allgemeinen hat ein einzelner aufgenommener FID auch nach der Verstärkung ein zu schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis, als daß eine sinnvolle Auswertung möglich wäre. Deshalb werden mehrere nacheinander aufgenommene FIDs im Rechner addiert, wobei sich das Signal-Rausch-Verhältnis proportional zur Wurzel der Zahl der addierten FIDs verbessert (siehe Kap. 4.1.). Das akkumulierte zeitabhängige Signal wird dann durch Fourier-Transformation in das frequenzabhängige Signal, das Spektrum, umgewandelt, das auf einem Plotter ausgegeben oder im Rechner weiter ausgewertet werden kann.

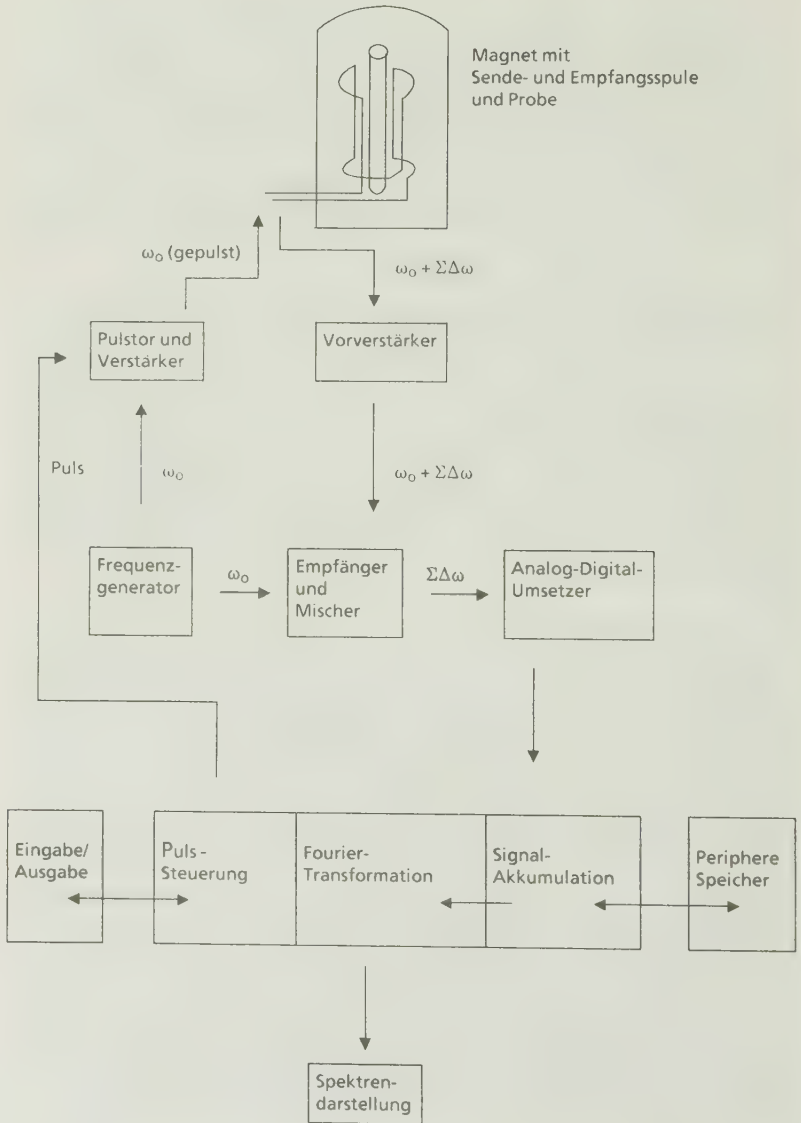


Abbildung 2-2: Die Elemente eines FT-NMR-Spektrometers

3. Aufbau und Energiestoffwechsel autotropher Mikroorganismen

3.1 Aufbau einer autotrophen eukariotischen Zelle

Lebende Zellen sind Systeme, die verglichen mit ihrer Umwelt einen hohen Ordnungsgrad und damit eine sehr niedrige Entropie aufweisen. Zum Überleben und zum Wachstum ist daher eine kontinuierliche Zufuhr von Energie notwendig. Eine Gruppe von Lebewesen kann ihren Energiebedarf nur dadurch decken, daß sie von außen zugeführte organische Stoffe, zum Beispiel Zucker oder Stärke, durch enzymkatalysierte Reaktionen oxidiert. Diese Gruppe von Organismen wird als heterotroph bezeichnet. Tierische Lebewesen sind heterotroph, aber auch einige pflanzliche Organismen, zum Beispiel Mycophyten (Pilze).

Ihnen gegenüber stehen autotrophe Organismen. Diese sind in der Lage, alle lebensnotwendigen organischen Verbindungen aus anorganischen Stoffen selbst zu synthetisieren. Die dazu notwendige Energie wird im Photosyntheseprozess aus absorbiertem Licht gewonnen. Im Dunkeln leben auch autotrophe Organismen von der Oxidation organischer Stoffe, die mit überschüssiger Energie im Licht synthetisiert und gespeichert worden sind, zumeist in Form von Polysacchariden wie Stärke. Auch fakultativ heterotrophe Lebensweisen sind bekannt. Autotrophe Organismen mit einem Photosyntheseapparat werden stets zu den pflanzlichen Lebewesen gezählt.

Während Stoffwechselprozesse in sogenannten Prokaryonten in einem Zellinnenraum ablaufen, der nicht weiter unterteilt ist, zeichnet sich eine eukaryotische Zelle aus durch die Existenz mehrerer membranumschlossener Kompartimente mit unterschiedlichen Funktionen im Stoffwechsel. Eine schematische Darstellung eines pflanzlichen Einzellers ist in Abbildung 3-1 gegeben.

Die Zelle wird umhüllt von der Plasmamembran (oder Plasmalemma), die aus einer Lipiddoppelschicht besteht, in der Proteine eingebettet sind. Für die meisten Ionen und größeren Moleküle ist sie weitgehend impermeabel. Es existieren jedoch Transportsysteme, die den Stoffaustausch zwischen Zellinnerem und Außenraum vermitteln, wobei der Austausch sowohl passiv, das heißt in Richtung eines elektrochemischen Potentialgefälles erfolgen kann, als auch aktiv, unter Verbrauch von

Energie, gegen ein Gefälle. Ein Transportprozeß kann auch an einen anderen gekoppelt sein, wodurch zum Beispiel ein Ladungsausgleich erfolgen kann (Kotransport).

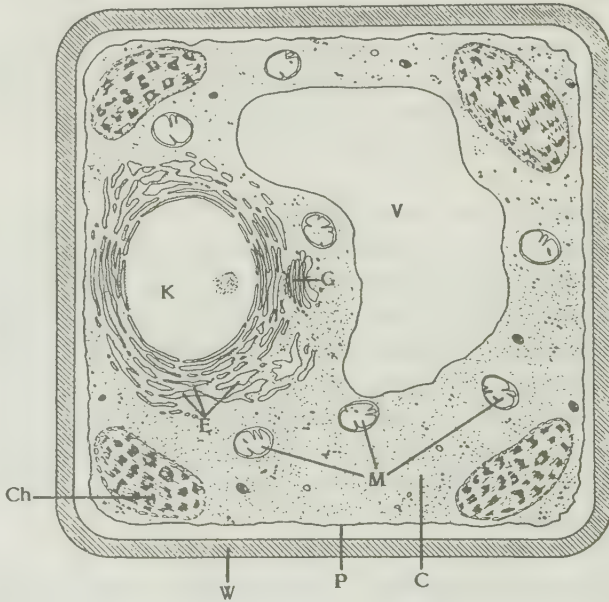


Abbildung 3-1: Zelle eines pflanzlichen Eukaryonten (schematisch)
C: Cytoplasma, K: Zellkern, P: Plasmalemma,
W: Zellwand, V: Vakuole, M: Mitochondrien,
Ch: Chloroplasten, G: Golgi-Apparat,
E: endoplasmatisches Retikulum mit Ribosomen

Bei den meisten pflanzlichen Zellen ist das Plasmalemma noch von einer Zellwand umgeben, die zumeist eine massive Struktur aus Polysacchariden darstellt. Sie schützt die Zelle vor allem vor mechanischen Belastungen und ist für gelöste Moleküle durchlässig, solange sie nicht

zu groß sind. Der Raum zwischen Zellwand und Plasmalemma wird als periplasmatischer Raum bezeichnet.

Innerhalb der Plasmamembran befinden sich das Cytoplasma und verschiedene, zum Teil membranumhüllte Organellen, deren wichtigste hier kurz dargestellt werden.

- Im Zellkern ist das genetische Material der Zelle konzentriert. Hier findet die Synthese derjenigen Nukleinsäuren statt, die die genetische Information tragen. Der Kern ist von einer Membran mit großen Poren umgeben, so daß die Konzentration der meisten kleineren Moleküle und Ionen im Zellkern derjenigen im übrigen Cytoplasma entsprechen dürfte.
- Die Mitochondrien bestehen aus einer einhüllenden äußeren und einer inneren Membran, die vielfach gefaltet ist. Die innere Membran umschließt die sogenannte Matrix, zwischen beiden Membranen liegt der Intercristaeraum. In den Mitochondrien erfolgen die letzten Schritte des vollständigen oxidativen Abbaus organischer Verbindungen zu CO_2 und H_2O während der Atmung. Im Dunkeln wird hier der größte Teil der Energie bereitgestellt.
- Die Chloroplasten sind ihrerseits kompartimentiert. Sie sind von einer einzelnen durchgehenden äußeren Hüllmembran umgeben. Die innere Membran ist ebenfalls kontinuierlich, weist aber lamellenartige Einfaltungen auf, die sich in regelmäßigen Abständen zu plattenförmigen Vesikeln, den Thylakoiden, erweitern. Der von der inneren Membran umhüllte Raum wird als Stroma bezeichnet, das Innere der Thylakoiden ist das Lumen. Weitere Vesikel, die keine direkte Verbindung zur inneren Membran besitzen, werden als Stroma-Thylakoide bezeichnet. Meist sind die Thylakoide zu Stapeln, sogenannten Grana, angeordnet. In den Thylakoidmembranen befindet sich der Photosyntheseapparat, durch den einfallendes Licht in zellulär verfügbare Energie umgewandelt wird, wobei Sauerstoff aus Wasser freigesetzt wird. Im Stroma wird die gewonnene Energie zur Fixierung von CO_2 in Zucker verwendet. Oft sind Stärkemoleküle im Chloroplasten eingelagert.
- Die Vakuole ist ein von einer Tonoplast genannten Membran umgebener flüssigkeitsgefüllter Raum, in dem sowohl organische als auch an-

organische Verbindungen und Ionen gespeichert werden. Der vakuoläre pH liegt zumeist recht niedrig ($< \text{pH } 5$), da die Vakuole organische Säuren speichert.

- Als Cytoplasma im engeren Sinne wird im folgenden das intrazelluläre Milieu ohne Chloroplasten, Mitochondrien und Vakuole, die als gesonderte Kompartimente behandelt werden, betrachtet. Da die Barriere zwischen dem Kern und seiner Umgebung durchlässig ist, wird in Bezug auf den Energiestoffwechsel auch nicht zwischen Kern und Cytoplasma unterschieden.

Im Cytoplasma befindet sich als weitere Organelle das endoplasmatische Retikulum, das ein intrazelluläres Transportsystem darstellt. An seiner Oberfläche befinden sich Ribosomen, die membrangebundene Enzyme enthalten, welche die Synthese von Proteinen und Membranlipiden katalysieren.

Mit dem endoplasmatischen Retikulum verbunden ist der Golgi-Apparat, der Transportprozesse aus der Zelle heraus initiiert. Er sondert Vesikel ab, die nach Wanderung zur Plasmamembran ihren Inhalt in den Außenraum der Zelle ausschütten.

Ein wesentlicher Teil des Energiestoffwechsels läuft im Cytoplasma ab, darunter die ersten Schritte der Energiegewinnung aus Hexosen durch Atmung. Bei Abwesenheit von Sauerstoff findet die Bereitstellung von Energie durch Gärung oder Glykolyse vollständig im Cytoplasma statt.

3.2 Das Adenylatsystem

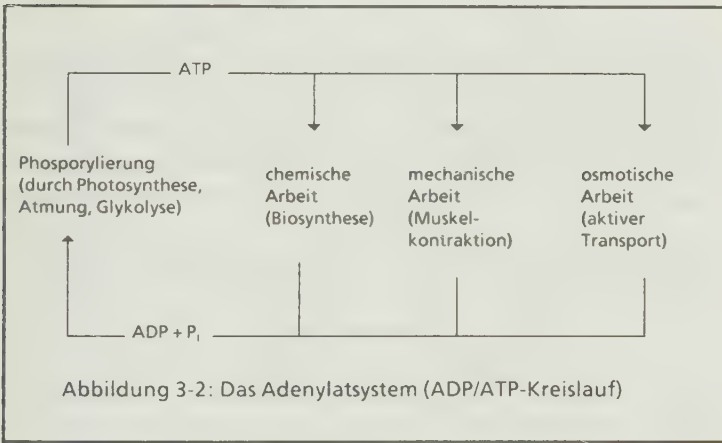
Der Ort der Energiegewinnung ist im allgemeinen vom Ort der Energienutzung räumlich getrennt. Daher ist ein Übertragungssystem notwendig, das gespeicherte Energie transportieren kann. Diese Aufgabe wird in fast allen biologischen Systemen vom Adenylatsystem übernommen, das Energie als Bindungsenergie einer Phosphatgruppe zu speichern vermag (Abb. 3-2).

Unter Energieaufwand wird ADP zu ATP phosphoryliert. ATP diffundiert von seinem Produktionsort an den Ort, wo Energiebedarf besteht; dort wird es hydrolysiert. Die freiwerdende nutzbare Bindungsenergie

wird zum Betrieb eines endergonischen Prozesses verwendet. Für die Nutzung der in ATP gebundenen Energie ist die Änderung an freier Enthalpie ΔG_{ATP} von entscheidender Bedeutung, die mit der Hydrolyse eines Mol ATP verbunden ist:

$$\Delta G_{\text{ATP}} = \Delta G_{\text{O}} + R T \ln \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{P}_i]} \quad (3.1)$$

ΔG_{O} ist die Änderung der freien Energie unter Standardbedingungen (bei biochemischen Prozessen 25 °C, pH 7), R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur.



Unter Hydrolyse von ATP und P_i können solche Prozesse spontan ablaufen, für deren Änderung der freien Enthalpie ΔG gilt

$$\Delta G - \Delta G_{\text{ATP}} < 0 \quad (3.2)$$

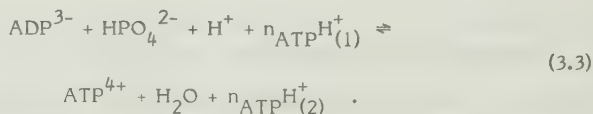
Das Argument des Logarithmus in Gleichung (3.1) wird als Phosphorylierungspotential bezeichnet. Es ist ein Maß für die Fähigkeit der Zelle, ATP-abhängige Prozesse durchzuführen.

Bei speziellen Prozessen kann ATP auch zu AMP hydrolysiert werden. Andere als Adenosinnukleotide spielen für den Energiestoffwechsel keine wesentliche Rolle.

Im Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel stehen die Elektronenübertragungssysteme aus Flavin-Adenin-Dinukleotiden und Nikotin-Adenin-Dinukleotiden. Reduktionsprozesse können ablaufen, indem Elektronen zum Beispiel von NADH oder NADPH abgegeben werden, wodurch diese ihrerseits oxidiert werden; bei Oxidationen können Elektronen auf die oxidierten Formen NAD^+ oder NADP^+ übertragen werden.

3.3 Die Photophosphorylierung

Die Phosphorylierung von ADP kann als glykolytische, oxidative oder Photophosphorylierung stattfinden. In den beiden letzteren Prozessen ist die ATP-Bindung an einen räumlichen Elektronentransport gekoppelt, und zwar von NADH zu O_2 bei der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien, und von H_2O zu NADP^+ unter der Nutzung von Lichtenergie bei der Photophosphorylierung in den Chloroplasten. Nach der chemiosmotischen Theorie erzeugt der Elektronentransport in beiden Fällen eine elektrochemische Potentialdifferenz über eine Membran, die sogenannte Kopplungsmembran. Der exergonische Protonenfluß durch in dieser Membran befindliche Enzyme, die ATPasen, hindurch ermöglicht die endergonische Bildung von ATP an den ATPasen. Die Bilanzgleichung lautet



($\text{H}_{(1)}^+$ = Protonen in der sauren Phase, $\text{H}_{(2)}^+$ = Protonen in der alkalischen Phase, n_{ATP} = für die Phosphorylierung eines ADP-Moleküls notwendige Zahl translozierter Protonen.)

Dabei liegt n_{ATP} zwischen 2 und 3.

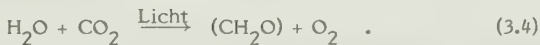
Im autotrophen Organismus ist die Photophosphorylierung im Chloroplasten der primäre Prozeß der Energiegewinnung. Kopplungsmembran ist die Thylakoidmembran. Durch Absorption einfallenden Lichtes werden hier befindliche Chlorophyllmoleküle in einen angeregten Zustand versetzt. Sie leiten die Anregung zu einem Photosystem II genannten Reaktionszentrum, das an der Innenseite der Membran, also im Lumen, H_2O zu O_2 und Protonen oxidiert. Die dadurch dem Wasser entzogenen Elektronen reduzieren Plastochinon, das seinerseits ein Proton an der

stromatären Seite der Membran aufnimmt. Durch Anregung des Reaktionszentrums des Photosystems I wird das Proton an das Lumen abgegeben, und die dem Wasser entzogenen Elektronen reduzieren an der stromatären Seite der Membran NADP^+ zu NADPH.

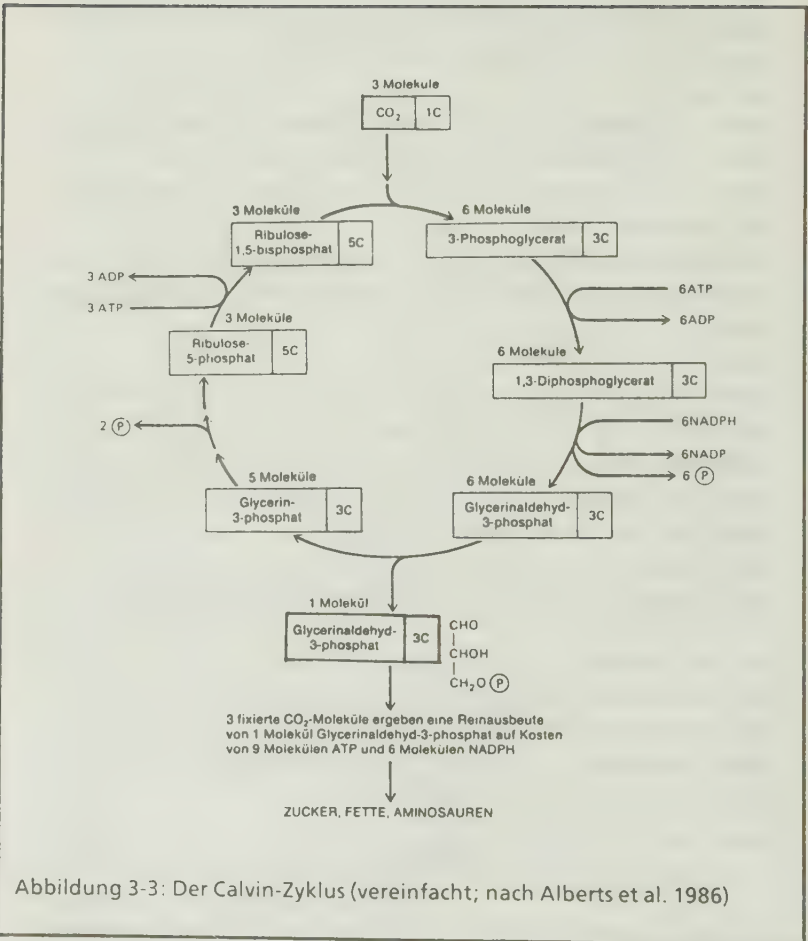
Durch die Freisetzung von H^+ bei der Wasserspaltung am Photosystem II, den H^+ -Transport durch das Plastochinon und den Verbrauch von H^+ bei der NADP^+ -Reduktion wird ein pH-Gradient über die Thylakoidmembran aufgebaut. Protonen strömen dann aus dem sauren Lumen in das alkalische Stroma. Die dadurch freiwerdende Energie wird von ATP-Synthasen zur Bildung von ATP an der stromatären Seite der Membran verwendet.

Neben dem nichtzyklischen Elektronentransport von H_2O auf NADPH sind weitere an ATP-Produktion gekoppelte Elektronentransportwege möglich, darunter der zyklische, an dem nur das Photosystem I beteiligt ist und der keine Freisetzung von Sauerstoff bewirkt. Seine quantitative Bedeutung in vivo ist nicht vollständig geklärt.

Im Stroma liefert das an der Thylakoidmembran gebildete ATP die notwendige Energie für die CO_2 -Fixierung, die im sogenannten Calvin-Zyklus oder reduktiven Pentosephosphat-Zyklus stattfindet. Die notwendigen Reduktionsäquivalente liefert das gleichfalls an der Thylakoidmembran gebildete NADPH (Abb. 3-3). Das in Glukose fixierte CO_2 wird weiter polymerisiert zu Polysacchariden, die als Stärke im Zellinneren deponiert werden. Zusammengefaßt gilt



Mit dem Cytoplasma steht das Stroma über den Phosphat-Translokator in Verbindung; im Austausch gegen importiertes Phosphat wird Glycerinaldehyd-3-Phosphat aus dem Stroma exportiert, das durch Einschleusung in den Glykolyseweg Energie zur Bildung von ATP im Cytoplasma liefern kann. Ein Austausch von ATP und ADP über die Chloroplastenmembran wie auch ein Transport von Hexosephosphat spielt im Licht keine wesentliche Rolle. Nur im Dunkeln erfolgt mit geringer Aktivität ein Transport von ATP aus dem Cytoplasma in das Stroma (Heldt 1976).

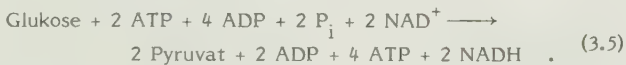


Es wird deutlich, daß im Licht ein deutlicher Protonengradient über die Thyklakoidmembran besteht. Inwieweit das Stroma auch relativ zum Cytoplasma alkalisch ist, ist nicht abschließend geklärt. Diese Frage wird im Zusammenhang mit der Zuordnung des Phosphatsignals (Kap. 5.5.1) diskutiert.

3.4 Die Glykolyse

Im Dunkeln wird Energie aus dem Abbau gespeicherter Substanzen ge-

wonnen (Katabolismus). Aus Stärke abgespaltene Hexosen werden hauptsächlich durch Glykolyse oder den oxidativen Pentosephosphat-Zyklus metabolisiert. Während der letztere im wesentlichen der Lieferung von Reduktionsäquivalenten und Kohlenstoffskeletten für Synthesen zum Beispiel von Nukleotiden dient, ist die Glykolyse für die ATP-Gewinnung wichtig. Abbildung 3-4 zeigt die Reaktionsfolge, in der Glukose über eine Reihe phosphorylierter Zwischenprodukte bis zum Pyruvat abgebaut wird. Der ATP-Gewinn ist relativ gering (verglichen mit der Atmung). Es ergibt sich folgende Bilanz



Pro abgebautem Hexosemolekül werden damit netto 2 ATP-Moleküle gewonnen. Unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln ist dies der einzige Weg zur ATP-Gewinnung. Dann wird Pyruvat weiter zu Lactat abgebaut. Manche Organismen verfügen auch über die Fähigkeit, Pyruvat zu verschiedenen Endprodukten wie Formiat, Acetat oder Ethanol zu reduzieren, wobei das entstandene NADH wieder oxidiert wird.

Die Glykolyserate wird im wesentlichen durch die Aktivität zweier Enzyme, der Phosphofruktokinase und der Pyruvatkinase, geregelt. Die Regelung erfolgt über direkte oder indirekte Endprodukte der katalysierten Reaktion sowie durch Konzentrationen von Kationen oder Phosphat und den intrazellulären pH. Dadurch kann der Abbau von Hexosen und die Bereitstellung von ATP unter anaeroben Bedingungen beschleunigt werden.

3.5 Die oxidative Phosphorylierung

Unter aeroben Bedingungen erfolgt die wesentliche ATP-Produktion durch mitochondriale Aktivität. Das durch Glykose gebildete Pyruvat wird über Acetyl-CoA in den sogenannten Krebs-Zyklus oder Zitronensäure-Zyklus eingeschleust und zu CO_2 abgebaut (Abb. 3-5). Bei diesem Prozeß, der in der Matrix stattfindet, werden Elektronen auf NAD^+ übertragen. Das entstandene NADH wird an der als Kopplungsmembran dienenden inneren Mitochondrienmembran wieder oxidiert. Nach einem Transport über die Membran werden die vom NADH stammenden Elektronen auf O_2 übertragen, wobei unter Verbrauch von Protonen H_2O entsteht.

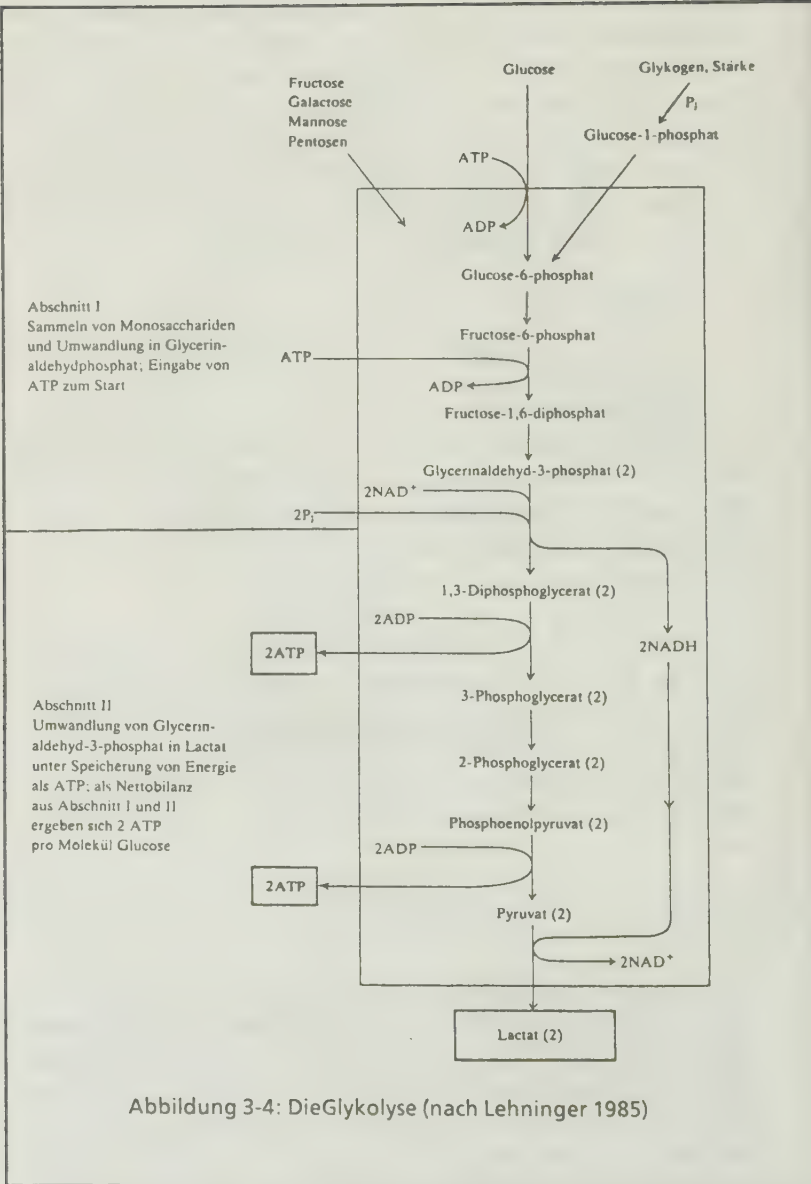


Abbildung 3-4: DieGlykolyse (nach Lehninger 1985)

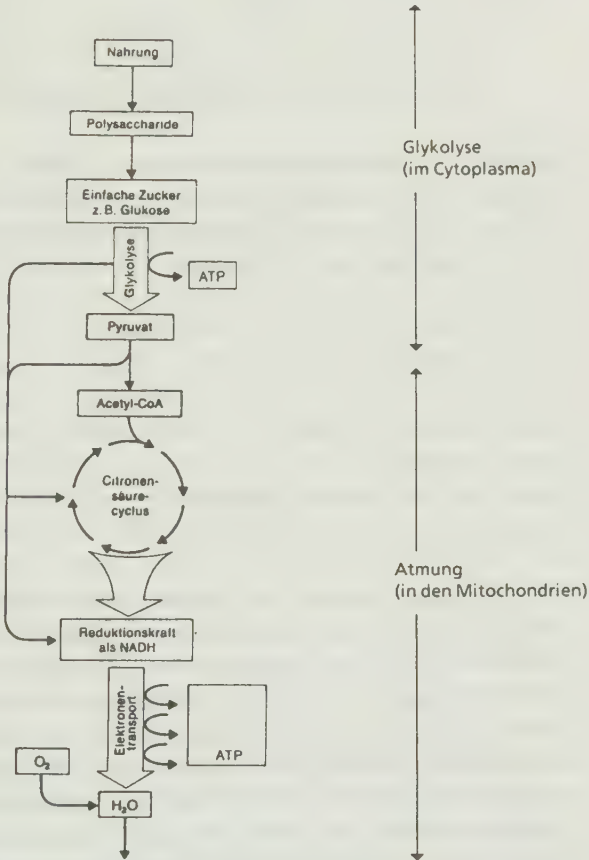
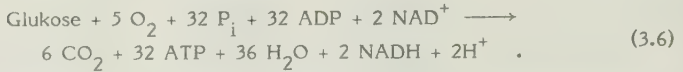


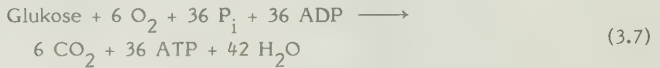
Abbildung 3-5: Vollständige Oxidation (Glykolyse und Atmung) von Glukose (schematisch; nach Alberts et al. 1986)

Durch den damit verbundenen Protonentransport wird die Matrix im Verhältnis zum Intercristaeraum alkalisiert. Der Protonenstrom durch

die in der Membran sitzenden ATPasen bewirkt die Bildung von ATP. Pro oxidiertem NADH werden drei ATP gebildet, so daß sich als Bilanzgleichung für die Atmung ergibt:



Pflanzliche Mitochondrien vermögen auch exogenes NADH aus dem Cytoplasma über die äußere Membran zu oxidieren. Unter der Annahme, daß zwei ATP pro NADH entstehen, ergibt sich unter Einbeziehung der der Atmung vorgeschalteten Glykolyse



wobei glykolytisch gebildetes ATP und NADH berücksichtigt sind.

Das in den Mitochondrien gebildete ATP ist auch im Cytoplasma verfügbar.

Die Ausnutzung eines über die Kopplungsmembran gebildeten elektrochemischen Gradienten für Protonen zur Erzeugung von ATP kann durch sogenannte Entkoppler unterbunden werden; während der Aufbau des Gradienten durch Elektronen- und Protonentransport weiterhin erfolgt, fließen die Protonen nicht durch die ATPasen. Als Entkoppler wirkende Protonophore wie DNP oder CCCP machen die Kopplungsmembran für Protonen durchlässig, so daß die als Potentialdifferenz gespeicherte Energie dissipiert wird. Zellen, die einem Entkoppler ausgesetzt sind, können ihren Energiebedarf auch unter aeroben Bedingungen oder im Licht nur durch Glykolyse decken.

In der Plasmamembran befindliche ATPasen sind grundsätzlich ähnlich wie ATPasen in den Kopplungsmembranen aufgebaut. Sie wirken aber meist in umgekehrter Richtung: sie spalten ATP und verwenden die freiwerdende Energie, um Ionen oder Moleküle gegen ein Konzentrationsgefälle durch die Membran zu transportieren.

Energie- und Leistungsbilanzen der Zellen werden in Kapitel 5.5.3 für die Alge *Platymonas subcordiformis* genauer diskutiert.

4. Anwendung der ^{31}P -NMR-Spektroskopie auf lebende Mikroorganismen in salzhaltigen Medien

4.1. Der Einfluß von Ionen auf NMR-Spektren

4.1.1 Einführung: Ionen in biologischen Proben

Für biologische Untersuchungen ist es wünschenswert, daß Kernspinresonanzspektren aufgenommen werden, während sich die vermessenen Organismen in ihrem natürlichen Medium befinden. Dieses ist bei marinen Organismen Seewasser unterschiedlicher Salinität. *Platymonas subcordiformis* wurde zum Beispiel in künstlichem Seewasser mit einer osmotischen Aktivität von circa 800 mosmol/kg kultiviert. Die dominierenden Salze sind NaCl mit 400 mM und MgCl_2 sowie MgSO_4 mit zusammen etwa 46 mM. Bei *Dunaliella parva*, die im selben Aufbau wie *Platymonas* gemessen worden sind (Gimmler et al. 1988), kann die Konzentration von NaCl im Medium auf über 1 M ansteigen – gemessen wurde in bis zu 1,5 M NaCl. Verglichen mit Süßwasseralgen wie *Chlorella fusca* mit ca. 20 mM Salzen im Medium (Sianoudis 1986) ist man bei marinen Algen mit erheblichen Ionenkonzentrationen in der Probe konfrontiert. Die Frage nach den Effekten dieser Ionenkonzentrationen auf die Spektren soll in diesem Kapitel untersucht werden; darüber hinaus wird der Einfluß von magnetischen Eigenschaften der Probe wie Suszeptibilitäten und Suszeptibilitätsgradienten betrachtet.

Charakteristisch für ein Spektrum sind Signal-Rausch-Verhältnis, chemische Verschiebung und Linienbreiten. Die Linienbreite hängt außer von Relaxationsmechanismen vor allem von der Homogenität des B_0 -Feldes ab; hierbei wirken sich Suszeptibilitätsgradienten im Probenvolumen aus.

Die chemische Verschiebung ist eine Funktion des lokalen Feldes am Ort eines resonierenden Kernes. Dieses hängt unter anderem ab von B_0 und von lokalen Entmagnetisierungsfeldern, also von Suszeptibilitäten in der Probe. Insbesondere beim Einsatz von paramagnetischen Ionen als Shiftreagenzien, zum Beispiel bei der ^{23}Na -NMR, können große Veränderungen von chemischen Verschiebungen relativ zu den verwendeten Standards auftreten.

Das bei einer Messung erreichbare Signal-Rausch-Verhältnis wird durch die Eigenschaften des Probenkopfes und des Vorverstärkers bestimmt. In einem gegebenen Meßaufbau hängt es von den elektrischen Eigenschaften der Probe ab, vor allem von deren Leitwert.

4.1.2. Untersuchungen zum Signal-Rausch-Verhältnis

4.1.2.1. Einführung: Ψ im NMR-Experiment

Das Signal-Rausch-Verhältnis Ψ ist im folgenden definiert als die gemessene Signalspannung U_S , geteilt durch den Effektivwert der Rauschspannung U_R . Es wird angenommen, daß das Rauschen unkorreliert weiß ist. Andere Beiträge zum Rauschen werden vernachlässigt.

Diese Definition des Signal-Rausch-Verhältnisses als Maß für die Qualität eines Spektrums ist nicht die einzig mögliche. In der NMR-Literatur wird es statt auf die Effektivspannung des Rauschens auch auf die Amplitude U_{SS} der Rauschspannung bezogen, die auch aus ausgeplotteten Spektren leicht ermittelt werden kann. Dann gilt die Beziehung

$$U_R = \frac{1}{2} U_{SS}.$$

Das Signal-Rausch-Verhältnis Ψ_0 eines Einzelspektrums bestimmt die Zahl n von Messungen (FIDs oder Spektren), die aufsummiert werden müssen, um ein für die jeweilige Fragestellung auswertbares (Gesamt-) Spektrum zu erhalten. Die zur Aufnahme dieses Spektrums notwendige Gesamtzeit ist bei gegebenen Relaxationszeiten und geeignet gewähltem festen Pulswinkel zu n proportional.

Die Signalintensität $U_S^{(n)}$ in einem n -fach aufsummierten Spektrum ist das n -fache der Intensität $U_S^{(1)}$ eines einzelnen Spektrums.

$$U_S^{(n)} = \sum_n U_S^{(1)} = n \cdot U_S^{(1)} \quad (4.1)$$

Das in den Spektren vorhandene weiße Rauschen wächst mit $\sqrt{n}$:

$$U_R^{(n)} = \sqrt{n} \cdot U_R^{(1)} . \quad (4.2)$$

$$\Psi_n = \frac{U_S^{(n)}}{U_R^{(n)}} \quad \text{ist also proportional zur } \sqrt{n} ; \text{ für ein gewünschtes } \Psi_n$$

benötigt man die Summe von

$$n = \left(\frac{\Psi_n}{\Psi_0} \right)^2 \quad (4.3)$$

Spektren.

Die verschiedenen Faktoren, die Ψ_0 beim NMR-Experiment beeinflussen, sind von Abragam (1961) zusammengefaßt worden:

$$\Psi_0 = K \eta J_0 \frac{(\mu_0 \omega_0 V_s Q)^{1/2}}{(4 F k T_s \Delta f)^{1/2}} \quad (4.4)$$

Einige der in dieser Gleichung enthaltenen Größen beschreiben Eigenschaften der Spule: V_s ist das Volumen, das die Empfangsspule umschließt, T_s ist ihre Temperatur und K ist ein dimensionsloser Koeffizient der Größenordnung 1, der von der Geometrie der Spule abhängt. Gleichzeitig vom Resonanzkreis und von Eigenschaften der Probe hängen Q und η ab: Q ist der Gütefaktor des Resonanzkreises, der unter anderem eine Funktion der Leitfähigkeit der Probe ist; der "Füllfaktor" η gibt den durch die Probe eingenommenen Anteil des Spulenvolumens an. J_0 bezeichnet die Kernmagnetisierung, die zu B_0 proportional ist, aber auch von der Konzentration der Probe abhängt. Die Larmorwinkel-frequenz ω_0 hängt für einen gegebenen Kern von B_0 ab. Eigenschaften des Spektrometers werden beschrieben durch Δf , die Bandbreite des Empfängers (angegeben in Hertz), und F , den Rauschfaktor des Vorverstärkers. Er ist ein Maß für zusätzliches Rauschen, das durch den Verstärker erzeugt wird. Schließlich enthält Gleichung (4.4) die Naturkonstanten k , die Boltzmannkonstante, und μ_0 , die Permeabilität des Vakuums.

Für das CW-Experiment sind die gegenseitigen Abhängigkeiten der Parameter untersucht und ausgehend von der Gleichung (4.4) das praktisch erreichbare Ψ abgeschätzt worden (Hill und Richards 1968).

Eine andere Darstellung von Ψ haben Hoult und Richards gegeben. Sie gehen davon aus, daß ein rotierender Dipol eine Spannung in einer Spule erzeugt, die dem Magnetfeld proportional ist, das diese Spule ihrerseits am Ort des Dipols erzeugt, wenn sie von einem festen Strom durchflossen wird (in englischsprachigen Veröffentlichungen wird auf diesen Sachverhalt oft mit dem Begriff "principle of reciprocity" Bezug genommen). Die meßbare Signalspannung wie auch die Rauschspannung leiten die Autoren aus Größen her, die im Prinzip auch für beliebige Spulengeometrien berechenbar sind (Hoult und Richards 1976, Hoult 1978):

$$\Psi_o = \frac{K' \omega_o B_1^* J_o V_p}{(8 F k T_s \Delta f R_s)^{1/2}} \quad (4.5)$$

wobei statt V_s das im aktiven Bereich der Spule befindliche Probenvolumen V_p und statt der mehr oder weniger phänomenologischen Größen Q und η der Spulendrahtwiderstand R_s und das in der Empfängerspule erzeugte Magnetfeld pro Einheitsstrom B_1^* in der xy-Ebene betrachtet wird. Auch in Gleichung (4.5) ist ein Koeffizient K' enthalten, der spezifisch für die Geometrie der Empfangsspule ist. Mit K' wird vor allem berücksichtigt, daß das Feld B_1^* im allgemeinen nicht über das gesamte Volumen der Spule konstant ist, sondern an den Rändern stark abnimmt (Hayes et al. 1985, Pelnar 1986).

Elektrische und induktive Verluste, die die Spulengüte Q verändern, zum Beispiel bei Messungen am menschlichen Körper, können in Gleichung (4.5) berücksichtigt werden, wenn der ohmsche Widerstand im Spulendraht R_s durch Ersatzwiderstände R_m , die induktive, und R_e , die dielektrische Verluste beschreiben, ergänzt wird (Hoult und Lauterbur 1979, Gadian und Robinson 1979). Dies ist insbesondere wichtig für die Abschätzung der räumlichen Auflösung bei bildgebenden NMR-Verfahren; bei großen Objekten ist hier auch die Eindringtiefe des hochfrequenten B_1 -Feldes in die Probe zu berücksichtigen, die durch den "Skin-Effekt" verringert wird (Libore und Singer 1980).

Die für das CW-Experiment hergeleiteten Ausdrücke für Ψ_o gelten für das FT-Experiment gleichermaßen, wenn statt der Bandbreite Δf des Empfangskreises die Aufnahmedauer für den FID, Δt , für die Berechnung des Rauschens herangezogen wird (Mackenzie 1986).

In Hochauflösungsspektrometern ist eine Verschlechterung von Ψ_0 bei Anwesenheit von Salzen in der Probe beobachtet worden (Bock et al. 1980). Erhitzung der Probe durch die Entkopplerleistung, den Skineffekt, oder die Verstimmung des Resonanzkreises (Daugaard et al. 1981) werden als mögliche Ursachen angesehen.

Im folgenden wird gezeigt, daß ausgehend von Gleichung (4.4) wie auch von Gleichung (4.5) das erreichbare Ψ_0 bei der Messung elektrisch leitender Proben aus der Leitfähigkeit der Probe berechnet werden kann. Die Änderungen von Ψ_0 bei unterschiedlichen Leitwerten sind in den üblicherweise verwendeten Sattelspulen im wesentlichen auf induktive Verluste zurückzuführen. Außerdem wird dargestellt, wie Ψ_0 bei stark leitenden Proben durch eine Modifikation des Probenbehälters verbessert werden kann. Die bei den hier verwendeten Spektrometern übliche Anpassung der Probenköpfe an 50Ω führt dazu, daß Änderungen von Ψ_0 auf Änderungen der Signalspannung zurückzuführen sind, während das Rauschen konstant bleibt. Daraus ergeben sich Konsequenzen für die Bestimmung von Konzentrationen durch Messungen der Signalintensität.

4.1.2.2 Berechnungen von Ψ aus meßbaren Größen

Ausgehend von der Darstellung von Hoult und Richards (1976) wird Gleichung (4.5) hergeleitet.

In einem Leiter, der an einem Punkt ein Feld $\vec{B}_1$ erzeugt, wenn er vom Einheitsstrom durchflossen wird, wird seinerseits von einem an diesem Punkt befindlichen rotierenden magnetischen Dipol $\vec{m}$ eine Spannung

$$U = - \frac{\partial}{\partial t} \{ \vec{B}_1^* \cdot \vec{m} \} \quad (4.6)$$

induziert ($\vec{B}_1^*$ ist das Feld $\vec{B}_1$ pro Einheitsstrom durch den Leiter: $\vec{B}_1^* = \vec{B}_1 / I$). Für ein NMR-Experiment ist $\vec{m}$ zu ersetzen durch $d\vec{M}$, das kernmagnetische Moment im Volumenelement dV_p der Probe, das durch einen 90° -Puls aus der z-Richtung in die xy-Ebene gekippt worden ist. Dann gilt (mit $d\vec{M} = \vec{J} \cdot dV_p$)

$$d\vec{U} = i \vec{J} \cdot dV_p \exp (i\omega_0 - 1/T_2^*) t \quad (4.7)$$

ω_0 ist die Larmorfrequenz, T_2^* die effektive Spin-Spin Relaxationszeit

und $\vec{J}_0$ die in die xy-Ebene gekippte Kernmagnetisierung mit dem Betrag

$$|\vec{J}_0| = N \gamma^2 \hbar^2 I (I + 1) \frac{B_0}{3 k T_S} \quad (4.8)$$

Dabei ist N die Zahl der Spins mit der Larmorfrequenz ω_0 pro Volumeneinheit und γ das gyromagnetische Verhältnis.

Unter der Annahme, daß B_1 im Probenvolumen weitgehend homogen ist, das heißt $\int_{Vol} d\vec{M} = \vec{M} V$, gilt:

$$U_S = - \int_{Vol} \frac{\partial}{\partial t} \{ \vec{B}^* \cdot d\vec{M} \} dV_p = \frac{\partial}{\partial t} \{ \vec{B}^* \cdot \vec{M} \} V_p \quad (4.9)$$

beziehungsweise

$$U_S = K' \omega_0 B_1^* J_0 V_p \cos(\omega_0 t) e^{-t/T_2^*}, \quad (4.10)$$

wobei K' - wie in Gleichung (4.5) - als "Inhomogenitätsfaktor" die Feldinhomogenität beschreibt und B_1^* das B_1 -Feld in der xy-Ebene pro 1 A Stromfluß in der Spule ist (Einheit T A⁻¹).

Die probegefüllte Spule wirkt als Generator für die Signalspannung. U_S entspricht der Ursprungsspannung. Der Generatorwiderstand ist im abgestimmten Probenkreis der Resonanzwiderstand R. Damit ist die maximal abgebbare Leistung (Effektivwert) des Probenkreises

$$P_S = \frac{U_{S \text{ eff}}^2}{R} = \frac{(K' \omega_0 B_1^* J_0 V_p e^{-t/T_2^*})^2}{2 R} \quad (4.11)$$

Der Widerstand des Probenkreises ist eine Quelle für thermisches Rauschen. Nach dem Nyquist-Theorem gilt für die Rauschspannung U_R im Frequenzintervall Δf

$$U_{R \text{ eff}} = (4 k T R \Delta f)^{1/2} \quad (4.12)$$

Die als elektrische Leistung verfügbare thermische Leistung ist

$$P_R = 4 k T \Delta f \quad (4.13)$$

Diese Leistung ist vom Resonanzwiderstand R unabhängig.

Die Eingangsspannung an einem Vorverstärker mit festem Eingangswiderstand R_v ist $U' = \sqrt{P} \cdot 1/2 \sqrt{R_v}$. Für die am Vorverstärker gemessene Signalspannung gilt also

$$U_S' = \frac{K' \omega_o B_l^* J_o V_p e^{-t/T_2^*}}{(2 R)^{1/2}} \cdot \frac{1}{2} \sqrt{R_v} \quad (4.14)$$

und für das Rauschen

$$U_R' = (4 kT \Delta f)^{1/2} \cdot \frac{1}{2} \sqrt{R_v} \quad (4.15)$$

Wenn noch der schon beschriebene Rauschfaktor F für den Vorverstärker eingefügt wird, ergibt sich für $\Psi_o = \frac{U_S'}{U_R'}$

$$\Psi_o = \frac{K' \omega_o B_l^* J_o V_p e^{-t/T_2^*}}{(8 F kT \Delta f)^{1/2} R^{1/2}} \quad (4.16)$$

U_S' , U_R' und Ψ_o sind hier im Zeitbereich definiert. Nach einem Puls im FT-Experiment gibt U_S' die Effektivspannung des Signals an, das als FID mit $\exp(-t/T_2^*)$ abfällt. Das Rauschen enthält Anteile aus einem Frequenzintervall Δf , das durch die zeitliche Auflösung der Analog-Digital-Wandler bestimmt ist, die die Spannung registrieren. Im allgemeinen umfaßt Δf die doppelte Spektrbreite. Nach der Fouriertransformation des FID in ein Spektrum ist das korrespondierende Signal-Rausch-Verhältnis Ψ_o^{FT} im Frequenzbereich

$$\Psi_o^{FT} = \frac{K' \omega_o B_l^* J_o V_p}{(4 F kT R)^{1/2} (\tau)^{1/2}} T_2^* (1 - e^{-\tau/T_2^*}) \quad (4.17)$$

τ ist die Aquisitionszeit für einen FID (Mackenzie 1986). Wird $\tau \gg T_2^*$ gewählt, so hängt Ψ_o^{FT} linear von T_2^* ab.

Gleichung (4.17) läßt sich entsprechend der Formel von Abragam (Gleichung (4.4)) auch schreiben als

$$\Psi_o^{FT} = K \eta J_o \frac{(\mu_o \omega_o V_s Q)^{1/2}}{(2 F kT \tau)^{1/2}} T_2^* (1 - e^{-\tau/T_2^*}) \quad (4.18)$$

wenn

$$\eta = \frac{1}{2} \frac{V_p}{V_s} \quad (4.19)$$

und

$$L = B_l^2 \frac{2 V_s}{\mu_0} \quad (4.20)$$

gesetzt wird.

L ist die Induktivität der Spule, so daß für Q gilt

$$Q = \frac{\omega_0 L}{R} \quad (4.21)$$

Für eine Zylinderspule (Solenoid) stimmt Gleichung (4.20) genau, die Inhomogenitätsfaktoren K in Gleichung (4.4) bzw. (4.18) und K' in Gleichung (4.5) bzw. (4.17) können dann gleich gesetzt werden (Hoult und Richards 1976).

Für die in den Bruker-Meßköpfen verwendeten Sattelspulen werden die Bedingungen ebenfalls als näherungsweise erfüllt angesehen, da bei einer Abschätzung von Ψ die größeren Unsicherheiten bei der vollständigen Ermittlung aller Rauschquellen bestehen.

Aus den Gleichungen (4.14) und (4.15) ist zu erkennen, daß bei unverändertem Eingangswiderstand R_v des Vorverstärkers die Signalspannung U_s' sich mit R beziehungsweise wegen Gleichung (4.21) mit Q ändert, während das Rauschen U_R konstant bleibt.

4.1.2.3 Magnetische und dielektrische Verluste

Der Resonanzwiderstand R des Probenkreises ist die Summe dreier Anteile:

$$R = R_s + R_e + R_m \quad (4.22)$$

R_e und R_m repräsentieren dielektrische und induktive, das heißt magnetische Verluste, R_s ist der Widerstand des Empfängerkreises bei verlustfreien Proben. Der ohmsche Widerstand der Spule ist im Prinzip aus der

Spulengeometrie berechenbar

$$R_s = \frac{l}{q} \rho \quad , \quad (4.23)$$

wobei l die Länge des Spulendrahtes beziehungsweise bei den hier betrachteten Sattelspulen der Leiterfolie, q den effektiven Leiterquerschnitt unter Berücksichtigung des Skineffektes und ρ den spezifischen Widerstand des Leitermaterials - Silber oder Kupfer - darstellt.

Für eine Sattelspule der Höhe $2g$ und des Radius a gilt

$$R_s = 8a \left(\frac{g}{a} + \frac{\pi}{3} \right) \frac{\rho}{9} \quad (4.24)$$

(Hoult und Richards 1976).

Bei verlustfreien Proben sollte sich R_s hieraus berechnen lassen. Die Meßergebnisse zeigen aber, daß nach dieser Gleichung berechnete Widerstände von 50 bis 100 m Ω für großvolumige ^{31}P -Probenköpfe offenbar nicht den gesamten Verlustwiderstand des Kreises darstellen. Der "Proximity-Effekt" (wegen der räumlichen Nähe der Entkopplerspule), kapazitive und induktive Verluste in Bauteilen in Spulennähe sowie ohmsche Widerstände in den anderen Teilen des Resonanzkreises summieren sich im montierten Probenkopf auf 200 bis 300 m Ω .

Das Einführen einer Probe in die Spule führt zu zusätzlichen dielektrischen und magnetischen Verlusten. Die dielektrischen Verluste beruhen darauf, daß die Sattelspule eine Eigenkapazität besitzt. Das elektrische Feld durchdringt die Probe, die als Dielektrikum wirkt und die Spulenkapazität vergrößert. Das dürfte der wesentliche Grund dafür sein, daß die Resonanzfrequenz durch das Einführen einer wässrigen Probe zu niedrigeren Werten verschoben wird. Der Probenkreis muß neu abgestimmt werden.

Das elektrische Wechselfeld erzeugt im Dielektrikum Verluste, die durch einen parallel zur Spule liegenden Zweipol nach Abbildung 4-1 dargestellt werden können (Gadian und Robinson 1979).

Dabei ist C_p die Kapazität von Spule zu Probe, C_v die verteilte Kapazität in der Probe und R_d der Widerstand der Probe für die Richtung

des elektrischen Feldes, der zum Kehrwert der Leitfähigkeit der Probe proportional ist.

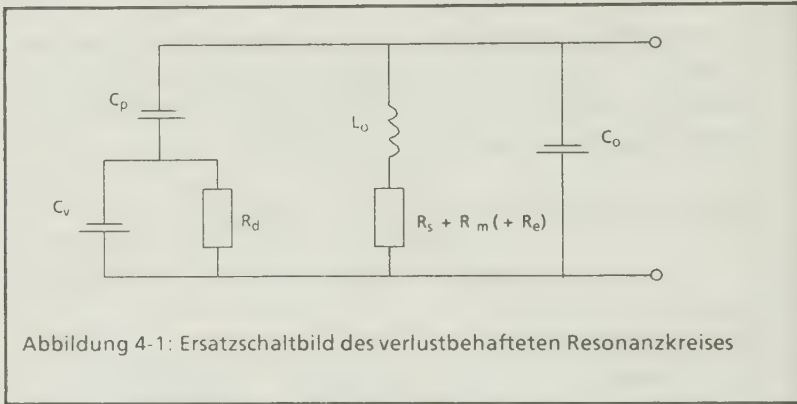


Abbildung 4-1: Ersatzschaltbild des verlustbehafteten Resonanzkreises

R_s und R_m sind der ohmsche Widerstand des Empfängerkreises und der Ersatzwiderstand für die magnetischen Verluste in der Probe.

Die Admittanz des Zweipols mit C_p , C_v und R_d ist

$$Y = \operatorname{Re} \{Y\} + j \operatorname{Im} \{Y\} \quad (4.25)$$

mit

$$\operatorname{Re} \{Y\} = \frac{\omega_o^2 R_d C_p^2}{1 + \omega_o^2 R_d^2 (C_p + C_v)^2} \quad (4.26)$$

und

$$\operatorname{Im} \{Y\} = \frac{\omega_o C_p - \omega_o^3 R_d C_p C_v (C_p + C_v)}{1 + \omega_o^2 R_d^2 (C_p + C_v)^2} . \quad (4.27)$$

Für $R_d = 0$ und $R_d = \infty$ ist der Zweipol verlustfrei,

für $R_d = \frac{1}{\omega_o (C_1 + C_2)}$ geht $\operatorname{Re} \{Y\}$ durch ein Maximum und erreicht

$$\operatorname{Re} \{Y\}_{\max} = \frac{\omega_o C_p^2}{C_p + C_v} \approx \omega_o C_p . \quad (4.28)$$

Der Beitrag der dielektrischen Verluste kann durch einen Serienwiderstand R_e repräsentiert werden, der nichtlinear von σ_{Probe} abhängt, ein Maximum vom Wert

$$R_e(\text{max}) = \frac{\omega_o L C_p^2}{2C_o (C_p + C_v)} \quad (4.29)$$

annimmt und für große und kleine σ gegen null geht.

Für Sattelspulen ist der dielektrische Verlust im allgemeinen klein, da $C_p \ll C_o$.

Der wichtigere Verlustmechanismus ist auf Wirbelströme zurückzuführen, die durch das magnetische Wechselfeld induziert werden.

Der Ersatzwiderstand für eine kugelförmige Probe mit dem Radius b und der spezifischen Leitfähigkeit σ in einer Sattelspule mit Radius a ist

$$R_m = \frac{4 \cdot 1,37 \pi \omega_o^2 \mu_o^2 b^5}{30 a^2} \sigma \quad (4.30)$$

(Hoult und Lauterbur 1979).

Die Probe in den hier verwendeten Meßköpfen ist im allgemeinen nicht kugelförmig, sondern zylindrisch, wobei die Zylinderachse senkrecht zum magnetischen Wechselfeld B_1 steht.

Wenn man vereinfacht statt des Zylinders eine Probe gleicher Höhe und gleichen Volumens, aber quadratischen Querschnitts betrachtet, gilt

$$R_m = \omega_o^2 B_1^{*2} b^5 \xi \frac{\pi^{5/2}}{32} \quad , \quad (4.31)$$

wobei ξ ein Faktor zwischen 3 und 5 ist, der vom Verhältnis der Spulenhöhe zum Probendurchmesser abhängt (siehe Anhang 1).

Es gilt also $R = R_s + R_e + R_m$. R_e wird zunächst vernachlässigt. R_s ist eine Konstante und R_m ist proportional zu σ .

$$\Psi \sim (R_s + R_e + R_m^* \sigma)^{1/2} \quad ,$$

wobei $R_m^* = R_m / \sigma$ der magnetische Verlustwiderstand pro Einheit der Probenleitfähigkeit ist.

4.1.2.4 Messungen zur Überprüfung des Modells

Um die oben hergeleitete Abhängigkeit der Größe Ψ von der spezifischen Leitfähigkeit der Probe experimentell zu prüfen, wurden in beiden verwendeten ^{31}P -Meßköpfen eine Reihe von Parametern in Abhängigkeit von Ionenkonzentrationen bestimmt. Obwohl wegen einiger vereinfachender Annahmen Ψ sicher nicht sehr genau berechnet werden kann, ist neben der qualitativen auch die quantitative Übereinstimmung von Theorie und Experiment untersucht worden. Dazu mußte eine Reihe von Parametern berechnet beziehungsweise abgeschätzt werden (Tab. 4-1).

Tabelle 4-1: Parameter der Probenköpfe

	31P 15 mm	31P 20 mm
$V_s^{1)}$	$6,6 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3$	$14,4 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3$
$V_p^{1)}$	$3,7 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3$	$9,7 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3$
$r_{\text{Probe}}^{1)}$	$6,75 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	$9,0 \cdot 10^{-3} \text{ m}$
$h_s^{1)}$	$26 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	$38 \cdot 10^{-3} \text{ m}$
$V_p / V_s \cdot 2\eta^{1)}$	0,56	0,67
$B_1^{*2)}$	$8,4 \cdot 10^{-5} \text{ T/A}$	$6,8 \cdot 10^{-5} \text{ T/A}$
$L^{3)}$	$0,074 \cdot 10^{-6} \text{ H}$	$0,107 \cdot 10^{-6} \text{ H}$
$B_1 (\sigma = 0)^{4)}$	$3,0 \cdot 10^{-4} \text{ T}$	$8,3 \cdot 10^{-4} \text{ T}$
$R_s^{2)}$	0,07 Ω	0,06 Ω
$R_m^{*5)}$	0,17 $\Omega^2\text{m}$	0,53 $\Omega^2\text{m}$
$\xi^{5)}$	3,7	4,2

Gemeinsame Parameter: $\omega_0 = 9,16 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$;
 $F = 2,3 \text{ dB} = 1,3$ (Auslegung des Vorverstärkers);
 $T_s = T_p = 293 \text{ K}$

1) Ausgemessen

2) Berechnet nach Hoult und Richards (1976)

3) Berechnet wie für eine Zylinderspule aus B_1^*

4) Berechnet aus 90° -Pulsdauer für $\sigma = 0$

5) Berechnung siehe Anhang 1

Die spezifische Leitfähigkeit der Probe wurde variiert durch Zugabe von NaCl bis zu einem maximalen σ von $8 \Omega^{-1} \text{m}^{-1}$ (bei 1 M NaCl). Gemessen wurden unabhängig voneinander der Gütefaktor Q , der 180° -Pulswinkel $\hat{=} \pi/\omega_1$ und das Signal-Rausch-Verhältnis Ψ für 5 mM KH_2PO_4 und 1 mM $\text{Na}_5\text{P}_2\text{O}_7$.

Die Beziehung der Größen zueinander ist in Abbildung 4-2 dargestellt.

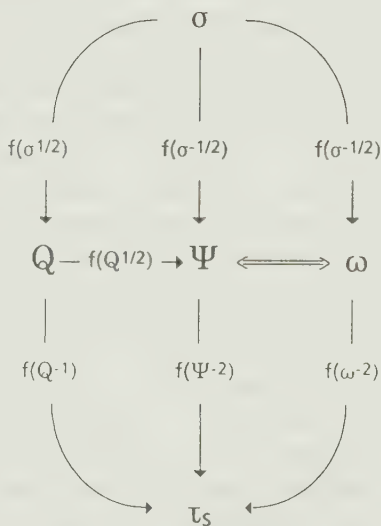


Abb 4-2: Beziehungen der behandelten Größen zueinander

Der Empfängerkreis wurde für jede Probe im Magneten optimal abgestimmt und angepaßt (der 15 mm-Kopf wurde aus technischen Gründen nur abgestimmt). Dazu wurde die vom Kreis reflektierte Spannung bei Resonanzfrequenz (145,78 MHz) in einem Aufbau nach Daugaard et al. (1981) mit einem Oszilloskop bestimmt. Als Frequenzquelle diente der jeweils am Gerät vorhandene Synthesizer. Die Resonanzkurven wurden in einigen Fällen ausgemessen, in anderen Fällen wurden nur die Frequenzen an der $1/\sqrt{2}$ -fachen Höhe der Kurve bestimmt.

Die zwischen leeren und mit wässrigen Proben gefüllten Spulen bestehenden erheblichen Unterschiede bezüglich der Abstimmung dürften in erster Linie auf die wegen der hohen Dielektrizitätskonstante des Wassers erhöhte Eigenkapazität der Spule zurückzuführen sein. (Hayes et al. (1985) vermuten dasselbe für ihren "Birdcage-Resonator".)

Der Gütefaktor Q wurde aus der Breite der Resonanzkurve des Empfängerkreises bei $1/\sqrt{2}$ -facher Höhe ermittelt. Dabei ist die Ablesegenauigkeit am Oszilloskop bei kleinen Breiten im Verhältnis zum abgelesenen Wert größer als bei großen Breiten. Q^{-1} ist auf circa $6 \cdot 10^{-4}$ genau, wobei Q^{-1} zwischen $3 \cdot 10^{-3}$ und $35 \cdot 10^{-3}$ liegt.

σ wurde aus den eingesetzten NaCl-Konzentrationen berechnet und um $0,045 \Omega^{-1} \text{m}^{-1}$ für 5 mM KH_2PO_4 erhöht (CRC Handbook). Die Leitfähigkeit von bidestilliertem Wasser wurde vernachlässigt.

Die Dauer des 90° -Pulswinkels wird bestimmt durch die Larmorfrequenz ω_1 um das in der Probe induzierte B_1 -Feld:

$$\omega_1 = \gamma B_1 = \gamma B_1^* \frac{\sqrt{P}}{\sqrt{R}} \quad (4.32)$$

P ist die Leistung des Pulsgenerators.

Ψ und ω_1 sind demnach für festes V_p , K'_p , F und P , das heißt für eine gegebene Kombination von Kopf, Pulsgenerator und Vorverstärker zueinander proportional. Im 20 mm-Kopf wurde $\Psi(\omega_1) = 3,75 \cdot 10^{-4} \omega_1$ und im 15 mm-Kopf wurde $\Psi(\omega_1) = 4,79 \cdot 10^{-4} \omega_1$ gemessen.

ω_1 wurde als das π -fache der Kehrwerte der 180° -Pulsdauer bestimmt.

Ψ wurde für eine 5 mM Lösung KH_2PO_4 an beiden Geräten und am 20 mm-Kopf zusätzlich an einer 2 mM KH_2PO_4 äquivalenten Menge von $\text{Na}_5\text{P}_2\text{O}_7$ in einer konzentrischen Kapillare ermittelt. Da Ψ innerhalb einer Probe bei unveränderter Linienbreite - das heißt auf die Intensität bezogen - linear von der Konzentration abhängt, wird Ψ auf 1 mM ^{31}P normiert angegeben.

Am 20 mm-Kopf wurden die Werte von Ψ zunächst nur relativ zueinander in willkürlichen Einheiten als Funktion von σ bestimmt, am 15 mm-

Kopf ist ω_1 gemessen worden, das nach Gleichung (4.32) zu Ψ proportional ist. Ein absoluter Wert für Ψ ist an beiden Meßköpfen für 5 mM KH_2PO_4 in H_2O bestimmt worden, auf den die zuvor gemessenen $\Psi(\sigma)$ - bezogen werden.

Um Einflüsse von Linienverbreiterungen durch Unterschiede beim Shim und unterschiedliches T_2 auszuschließen, wurden die Signale für alle Messungen auf dieselbe Linienbreite normiert. Bei Annahme einer idealen Lorentzform für die Signale wurde die Intensität als Höhe mal Halbwertsbreite $\Delta\nu_{1/2}$ (in Einheiten des Punktabstandes) bestimmt. Sie entspricht der Höhe eines Signals gleicher Intensität mit einer angenommenen Halbwertsbreite von einem Punkt ($\hat{=} 0,845$ Hz bei den verwendeten Meßparametern; das damit korrespondierende T_2^* ist $(\pi \cdot \Delta\nu_{1/2})^{-1} = 0,377$ s).

Der Effektivwert des Rauschens wurde durch einen DISNMR Standardbefehl ermittelt ("8" in der EP-Routine; Bruker DISNMR Manual).

Je 8 Scans wurden mit dem für jede Probe ermittelten 90° -Puls und einer Relaxationswartezeit von 60 s aufgenommen. Das einem einzelnen Scan entsprechende Ψ ist demnach das $1/\sqrt{8}$ -fache des gemessenen Ψ .

Die zeitlich diskrete Abtastung der Signale erhöht das Rauschen, da durch die Diskretisierung außerhalb des Spektrums liegende Frequenzanteile des Rauschens in das Spektrum hineingefaltet werden; durch das Verfahren der "Quadrature detection" und durch Filterung wird das zum Teil wieder rückgängig gemacht. Der berechnete Absolutwert von Ψ darf daher nur als grober Anhaltswert für das erreichbare Signal-Rausch-Verhältnis angesehen werden, zumal die Beiträge aus Verstärkern, Leitungen und Steckern sowie der sonstigen Elektronik hier nicht betrachtet werden.

4.1.2.5 Ergebnisse der Messungen

Mit $R = R_s + R_m$, $R_m = R_m^* \sigma$ (siehe Abb. 4-1) gilt

$$Q = \frac{\omega L}{R_s + R_m^* \sigma} \quad , \quad (4.33)$$

wenn angenommen wird, daß L im wesentlichen nicht von σ abhängt, und wenn R_e vernachlässigt wird. Eine lineare Funktion von σ ist dann

$$Q^{-1} = \frac{R_s}{\omega L} + \frac{R_m^*}{\omega L} \sigma \quad (4.34)$$

Q^{-1} ist als Funktion von σ für den 15 mm-Kopf und für den 20 mm-Kopf in Abbildung 4-3 dargestellt. Die Meßwerte streuen um eine Gerade. Die systematisch aussehenden Abweichungen bei den Leitwerten zwischen 0 und $2 \Omega^{-1} \text{ m}^{-1}$ sind möglicherweise auf dielektrische Verluste, die durch R_e repräsentiert werden, zurückzuführen. Zu gleichartigen Abweichungen der Güte von einer Geraden führen dielektrische Verluste in einer vergleichbaren Sattelspule von 35 mm, die Gadian diskutiert (Gadian und Robinson 1979).

Wenn L nach Gleichung (4.20) berechnet wird zu $L(20 \text{ mm}) = 0,11 \mu\text{H}$ und $L(15 \text{ mm}) = 0,075 \mu\text{H}$, ergibt sich aus dem Achsenabschnitt $R/\omega L = 0,003$ für beide Meßköpfe $R_s(20 \text{ mm}) = 0,28 \Omega$ und $R_s(15 \text{ mm}) = 0,21 \Omega$. Nach Gleichung (4.24) erhält man als berechnete Werte für $R_s(20 \text{ mm})$ 60 m Ω und für $R_s(15 \text{ mm})$ 70 m Ω . Diese Abweichungen werden in Kapitel 4.2.4 diskutiert.

Aus der Steigung der Geraden erhält man für den induktiven Verlustwiderstand pro Leitwert $R_m^*(20 \text{ mm}) 0,43 \Omega^2 \text{ m}$ und $R_m^*(15 \text{ mm}) 0,095 \Omega^2 \text{ m}$.

Der Wert für den 20 mm-Kopf liegt recht gut bei dem entsprechend Gleichung (4.31) berechneten $R_m^*(20 \text{ mm})_{\text{th}} = 0,53 \Omega^2 \text{ m}$, während die Abweichung für den 15 mm-Kopf mit $R_m^*(15 \text{ mm})_{\text{th}} = 0,16 \Omega^2 \text{ m}$ größer ist; angesichts der Unsicherheiten bei der Bestimmung von R_m^* ist die Übereinstimmung noch zufriedenstellend.

Wenn der Widerstand des Empfängerkreises R wie in Gleichung (4.33) dargestellt wird als $R = R_s + R_m^* \sigma$, läßt sich Gleichung (4.17) auch als lineare Funktion von σ schreiben:

$$\psi^{-2} = D^2 R_s + D^2 R_m^* \sigma \quad (4.35)$$

mit

$$D = \frac{(4 F k T \tau)^{1/2}}{K' \omega_o B_1^* J_o V_p T_2^* (1 - \exp(-\tau/T_2^*))} \quad (4.36)$$

Zunächst wird die Kurve für den 20 mm-Kopf in Abbildung 4-4 betrachtet. Sie entspricht der Darstellung von $Q^{-1}(\sigma)$ in Abbildung 4-3, was aufgrund der gleichartigen Abhängigkeit der Gleichungen (4.34) und (4.35) von σ erwartet wird. Im Bereich bis circa $2 \Omega^{-1} m^{-1}$ weicht $\Psi^{-2}(\sigma)$ von einer Geraden deutlich nach oben ab.

Für $\sigma = 0$ ergibt der Achsenabschnitt $6,4 \cdot 10^{-6}$. Nach Gleichung (4.35) ist $\Psi = 39,5$ für $1 \text{ mM } ^{31}\text{P}$. Daraus erhält man für D 0,047, wenn für R_s der aus $Q(\sigma)$ ermittelte Wert von $0,28 \Omega$ eingesetzt wird; derselbe Wert für D ergibt sich mit $R_m^* = 0,43 \Omega^2 m$ aus der Steigung der Geraden von $9,1 \cdot 10^{-4} \Omega m$.

Wenn man die in Tabelle 4-1 angegebenen Größen in Gleichung (4.36) einsetzt, erhält man $D = 0,018$ ($K' = 1$ gesetzt). Das heißt, das tatsächlich gemessene Ψ ist das 0,38-fache des theoretisch erreichbaren Wertes. Die Abweichung ist unter anderem auf zwei Gründe zurückzuführen: zum einen ist - wie bereits erwähnt - die Berechnung des Rauschens nur näherungsweise möglich; zum anderen ist der Inhomogenitätsfaktor K' kleiner als 1, da das B_1 -Feld zum Rand des Spulenvolumens hin deutlich abfällt (Hayes et al. 1985, Pelnar 1986). Angesichts dessen ist die Übereinstimmung zufriedenstellend.

Für den 15 mm-Kopf ist Ψ als Funktion von σ indirekt über ω_1 bestimmt worden, nachdem Ψ für ein spezielles ω_1 gemessen wurde. Die Kurve in Abbildung 4-4 zeigt einen Achsenabschnitt von $4 \cdot 10^{-3}$, entsprechend einem Ψ von 15,5. Die Steigung ist $1,3 \cdot 10^{-3}$. Damit ist $D = 0,15$ für $R_s = 0,18$ (abgelesen aus dem Achsenabschnitt) beziehungsweise $D = 0,12$ für $R_m^* = 0,09 \Omega^2 m$. Der aus Gleichung (4.36) berechnete Wert für D ist 0,038. Das gemessene Ψ ist damit das 0,25- bis 0,35-fache des theoretischen Wertes. Das benutzte Modell ergibt also für beide Meßköpfe die richtige Größenordnung für Ψ .

Zur Kontrolle dieser Rechnungen wird neben $Q(\sigma)$ und $\Psi(\sigma)$ auch $\Psi(Q)$ für den 20 mm-Kopf dargestellt (Abb. 4-5). Die Werte von $\Psi(Q)$ müssen mit

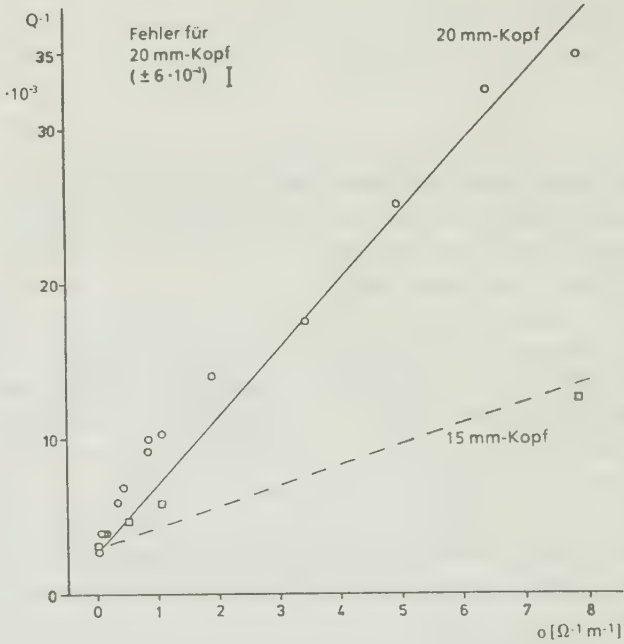


Abbildung 4-3: Q^{-1} als Funktion der Leitfähigkeit σ

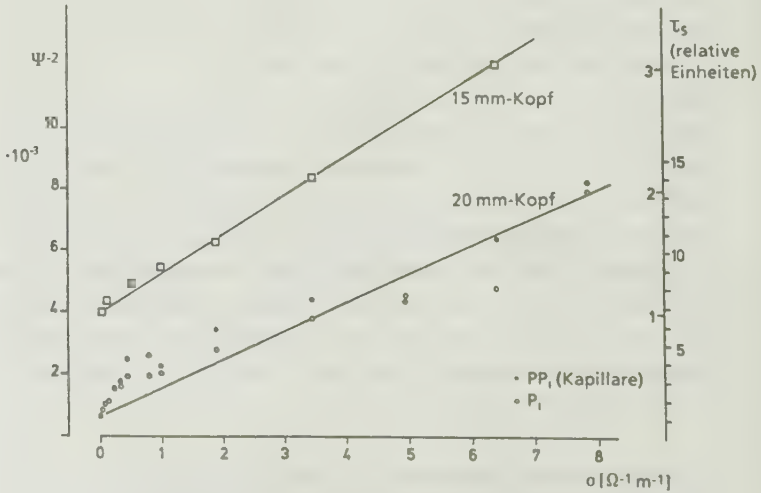


Abbildung 4-4: Ψ beziehungsweise τ_s als Funktion von σ
 τ_s angegeben in Einheiten von τ_s^0 in nicht leitenden Proben

den Messungen von $\Psi(\sigma)$ und $Q(\sigma)$ konsistent sein, wenn die Berechnungen numerisch korrekt sind und wenn Gleichung (4.20) auch bei den verwendeten Sattelspulen anwendbar ist. (Gleichung (4.20) wird bei der Umrechnung von $\Psi(\sigma)$ (nach Gleichung (4.17)) in $\Psi(Q)$ (nach Gleichung (4.18)) benutzt.)

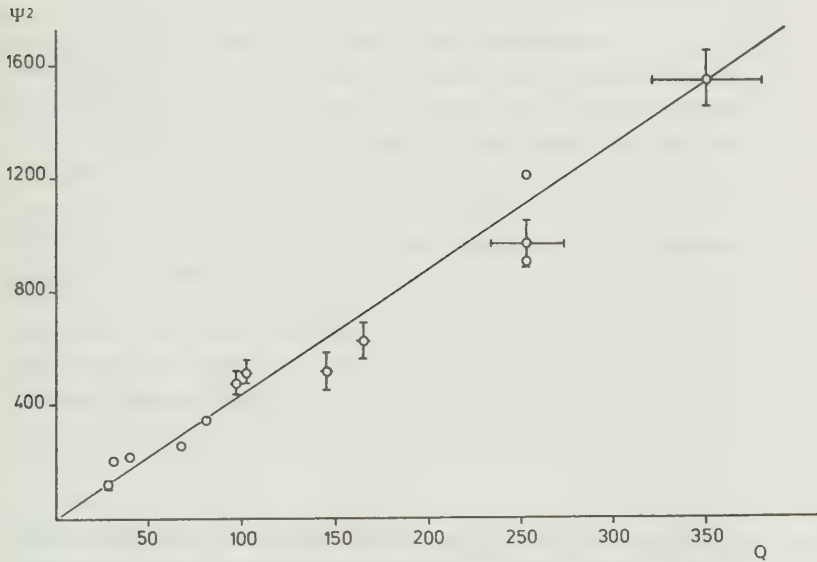


Abbildung 4-5: Ψ^2 als Funktion von Q (im 20 mm-Kopf)

Ψ hängt nach Gleichung (4.17) von Q ab wie

$$\Psi^2 = C^2 Q \quad . \quad (4.37)$$

Aus der Steigung der Geraden C^2 erhält man ein C von $2,1 \pm 1$.

Mit den in

$$C = K \eta J_0 \left(\frac{\mu_0 \omega_0 V_s}{2 F k T \tau} \right)^{1/2} T_2^* (1 - \exp(-\tau/T_2^*)) \quad (4.38)$$

eingesetzten Größen ist der berechnete Wert von $C = 5,7$ für $K = 1$. Die Abweichung des daraus berechneten Ψ vom gemessenen Wert ist 0,37. Das ist derselbe Faktor wie bei dem aus D berechneten Ψ .

4.1.2.6 Diskussion

Da $n \sim \Psi^{-2}$, stellt Abbildung 4-4 zugleich die für ein gewünschtes Ψ_s notwendige Meßzeit τ_s dar, bezogen auf die für Ψ_s bei $\sigma = 0$ notwendige Zeit τ_s^0 (rechte Skala in Abb. 4-4). τ steigt linear mit σ an. Bei $\sigma = 3,45$ entsprechend 400 mM NaCl ist τ gegenüber τ_s^0 im 20 mm-Kopf auf das sechsfache gestiegen, im 15 mm-Kopf dagegen nur auf das Doppelte (bezogen auf τ_s^0 im 15 mm-Kopf). Hierin spiegelt sich das erheblich größere R_m^* im 20 mm-Kopf wider; nach Gleichung (4.31) ändert sich R_m^* mit $V^{4/3}$ (B_1^* ist ungefähr proportional zu $V_s^{-1/3}$, b^5 entspricht $V_p^{5/3}$). Dabei ist der Füllfaktor η , der mit dem Spulenvolumen ebenfalls wächst, außer acht gelassen (Hill und Richards 1968)). In unserem Fall gilt $(V_p(20\text{mm}) / V_p(15\text{mm}))^{4/3} = 3,5$, während das gemessene Verhältnis R_m^* der beiden Meßköpfe zwischen 3 (berechnete Werte) und 4 (gemessene Werte) liegt.

Dessen ungeachtet ist die notwendige Meßzeit im 20 mm-Kopf stets kleiner als im 15 mm-Kopf, da der Vorteil des größeren Volumens, also des größeren magnetischen Dipolmomentes in der Spule, die Nachteile bei weitem überwiegt.

Das Dipolmoment wächst mit V_p . B_1^* nimmt ungefähr mit $V_s^{-1/3}$ ab, wenn sich das Verhältnis von Spulenhöhe zu -durchmesser nicht ändert. R_s ist im größeren Kopf wegen der größeren Länge des Spulendrahtes etwa um den Faktor 1,3 größer.

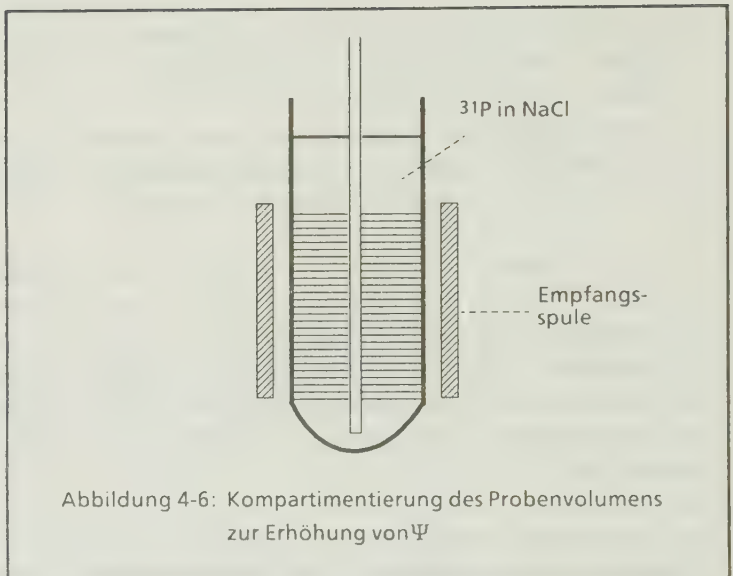
Aus Gleichung (4.17) erhält man für $\sigma = 0$ (d.h. $R = R_s$) eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses um den Faktor 1,7 beim Übergang vom 15 mm- zum 20 mm-Kopf bei gleicher Konzentration des gemessenen Kernes. Tatsächlich gemessen wurde eine Erhöhung von Ψ um 2,6,

das ist das 1,5-fache des berechneten Wertes. Abgesehen von der Unsicherheit beim Vergleich von Ψ an zwei verschiedenen Geräten können sich hierin Qualitätsunterschiede der Köpfe widerspiegeln, etwa unterschiedliche Inhomogenitätsfaktoren K und zusätzliche Rauschquellen. Mit wachsender Leitfähigkeit der Probe nimmt das Verhältnis $\Psi(20 \text{ mm})$ zu $\Psi(15 \text{ mm})$ ab; bei 1 M NaCl liegt es noch bei etwa 1,4, dies bedeutet, daß gleiches Ψ_s bei halber Meßdauer zu erreichen ist.

Um kurze Meßzeiten zu erreichen, wird ein möglichst hohes Ψ angestrebt. Von den in Gleichung (4.17) enthaltenen Parametern sind die meisten für das Spektrometer spezifisch. J_0 hängt auch von der Konzentration des gemessenen Kernes ab, die meist durch Anforderungen der Probe begrenzt ist. Außer einer geeigneten Wahl der Aquisitionszeit τ bleibt nur der Verlustwiderstand R als Größe, die durch Eingriffe an der Probe veränderbar ist.

Die magnetischen Verluste R_m sind als Verluste durch Wirbelströme beschrieben worden. Sie wachsen mit der senkrecht zum magnetischen Wechselfeld stehenden Fläche, in der Wirbelströme fließen. In der Elektrotechnik ist es üblich, Wirbelstromverluste zu reduzieren, indem Leiter, die im Magnetfeld liegen, senkrecht zur Wirbelstromrichtung, das heißt parallel zum Feld $\vec{B}_1$, in gegeneinander isolierte Lamellen aufgespalten werden.

Bei leitenden Proben im NMR-Röhrchen entspricht die Lamellierung einer Aufteilung der Probe in mehrere Kompartimente, deren Grenzen parallel zu $\vec{B}_1$ liegen. Der Effekt einer solchen Kompartimentierung kann am 20 mm-Kopf demonstriert werden. Zunächst wurde Q für eine Lösung von 1 M NaCl als 31 gemessen, die 90°-Pulsdauer lag bei 45 μs entsprechend einem Ψ von 13 für 1 mM ^{31}P . Dann wurde die Probe "kompartimentiert", indem 14 etwa äquidistante Scheibchen aus Transparentfolie, auf einem Glasstab aufgereiht, in das aktive Probenvolumen eingeführt wurden (Abb. 4-6). Q war dadurch auf 50 erhöht worden, die 90°-Pulsdauer betrug um 35 μs entsprechend einem Ψ von 17. Ψ hatte sich demnach um 1,3 verbessert, dies hätte für ein vorgegebenes Ψ eine Zeiteinsparung auf das 0,6-fache bewirkt. - Das Verhältnis der Ψ bei beiden Messungen wurde an der Intensität des Signals von circa 10 mM KH_2PO_4 überprüft.



Konsequenzen ergeben sich für Konzentrationsbestimmungen. Unter sonst gleichen Bedingungen ist nach Gleichung (4.10) die Signalspannung der Konzentration des untersuchten Kernes in der Probe proportional. Die beschriebenen Änderungen von Ψ mit der Leitfähigkeit werden bei festem τ nach Gleichung (4.14) durch Änderungen der Signalspannung U_S hervorgerufen. Daraus folgt, daß beim Vergleich unterschiedlicher Proben die Signalintensität nicht notwendig zur Konzentration des untersuchten Kernes proportional ist. Die Leitfähigkeit der Probe muß berücksichtigt werden. (Die Normierung der mit 5 mM KH_2PO_4 gemessenen Ψ auf 1 mM KH_2PO_4 ist in den hier dargestellten Messungen zulässig da die Partialleitfähigkeit von 5 mM KH_2PO_4 klein gegen die betrachteten totalen Probenleitfähigkeiten ist.) Entweder muß ein Konzentrationsstandard - im allgemeinen in einer Kapillare - in der untersuchten Probe vorhanden sein (der demselben Verlustwiderstand wie die Probe selbst unterworfen ist) oder externe Vergleichsproben bekannter Konzentration müssen für verschiedene σ geeicht werden. Der Verlustwiderstand der zu untersuchenden Probe muß dann ebenfalls bekannt sein; gegebenenfalls kann er aus ω_1 ermittelt werden.

Dies ist insbesondere zu beachten bei der Konzentrationsbestimmung von ^{23}Na in NaCl -Lösungen. Der Zähler von U_S wächst mit der ^{23}Na -Konzentration C_{Na} , der Nenner wächst in Abhängigkeit von $\sqrt{C_{\text{Na}}}$:

$$U_S(C_{\text{Na}}) \sim \frac{C_{\text{Na}}}{(R_s + R_m^* \sigma^* C_{\text{Na}})^{1/2}} \quad (4.39)$$

mit $\sigma = \sigma^* C_{\text{Na}}$.

Bei kleinem C_{Na} ist U_S proportional zur ^{23}Na -Konzentration, bei großen C_{Na} proportional zur Wurzel aus der Konzentration.

Das Signal eines internen Standards ist demselben Verlustwiderstand wie die Probe unterworfen, er kann daher ohne nähere Kenntnis von σ verwendet werden. Dasselbe gilt für den Vergleich unterschiedlicher Kompartimente derselben Probe. Der für größere Probenvolumina diskutierte Skineffekt (Libore und Singer 1980) würde dazu führen, daß ein in Probenmitte angebrachter Standard ein kleineres B_1^* erführe als das gesamte Probenvolumen im Mittel und daher nach dem Reziprozitätsprinzip ein zu kleines Signal abgäbe. In Abbildung 4-4 sind die Ψ für den 20 mm-Kopf sowohl für in der Probe homogen verteiltes KH_2PO_5 als auch für Pyrophosphat in einer konzentrisch in der Probe angebrachten Kapillare dargestellt. Auch bei großen σ weichen die Ψ nicht systematisch voneinander ab. Experimentell zeigt sich so, daß der Skineffekt bei den hier untersuchten Probenvolumina und Leitfähigkeiten zu vernachlässigen ist.

4.1.3. Einfluß der Probenssuszeptibilität auf die Signale

4.1.3.1 Lokale Felder und die chemische Verschiebung

Die chemische Verschiebung einer Kernes hängt vom lokalem Feld am Kernort ab

$$\omega_{\text{res}} = \gamma \mu_{\text{O}} H'_{\text{loc}} \quad . \quad (4.40)$$

H'_{loc} besteht aus drei wesentlichen Komponenten

$$H'_{\text{loc}} = H_{\text{O}} + H_{\text{CS}} + H_{\text{U}} \quad . \quad (4.41)$$

H_{O} ist das externe Feld des Magneten und damit geräteabhängig. H_{CS} ist das magnetische Abschirmfeld am Kernort, das von der Elektronenhülle des Atoms oder des Moleküls, das den Kern enthält, abhängt. Es bewirkt die "chemische Umgebung" des Kernes und ist damit für die "chemische Verschiebung" im eigentlichen Sinn verantwortlich. H_{U} ist ein Feld, das von den magnetischen Eigenschaften der Umgebung dieses Atoms oder Moleküls abhängt (Dickinson 1951).

Im allgemeinen wird H_{U} als für alle Kerne in der Probe gleich angesehen. Bei der Bestimmung von chemischen Verschiebungen mit externen Referenzen wird vorausgesetzt, daß das Feld auch in zwei verschiedenen Proben bei Verwendung desselben Lösungsmittels identisch ist.

Wenn das Probenvolumen als unendlich langer Zylinder angesehen werden kann, ist die Annahme gerechtfertigt. Korrekturen sind erforderlich, wenn chemische Verschiebungen in Proben parallel zum Feld - in supra-leitenden Magneten - mit solchen in Proben senkrecht zum Feld - in Elektromagneten - verglichen werden (Martin et al. 1980).

In großvolumigen Proben und in Proben mit mehreren Kompartimenten unterschiedlicher Suszeptibilität - zum Beispiel beim Einsatz paramagnetischer Verschiebungsreagenzien (siehe Kap. 7.) - sind diese Voraussetzungen nicht mehr gegeben. Das lokale Feld in den verschiedenen Kompartimenten hängt stattdessen ab von den Suszeptibilitätsdifferenzen und von der Form der Kompartimente.

4.1.3.2 Lokale Felder in den Kompartimenten der Probe

Bei Experimenten mit biologischen Proben sind meist drei Probenkompartimente vorhanden: das Medium, das Zellinnere und der Standard mit den Suszeptibilitäten χ_m , χ_z und χ_s sowie den von ihnen bestimmten inneren Feldern H_m , H_z und H_s . Für jedes Kompartiment gilt

$$H_{int} = H_{ext} - N \Delta\chi H_{int} \quad . \quad (4.42)$$

H_{int} ist das resultierende Feld im Inneren des Kompartimentes, auf das das Feld H_{ext} wirkt. $\Delta\chi$ ist die Differenz der Suszeptibilitäten im Inneren und außerhalb des Kompartimentes. N ist ein Entmagnetisierungsfaktor, der von der Form des Kompartimentes abhängt. Er kann für Ellipsoide (und deren Grenzfälle) berechnet werden (Osborn 1945). Von den praktisch möglichen Kompartimenten haben nur Ellipsoide ein homogenes Feld im Inneren, wenn sie in ein homogenes äußeres Feld gebracht werden. Die Probe im Probenröhrchen ist jedoch besser als Zylinder zu beschreiben. Für zylindrische Kompartimente endlicher Länge läßt sich ein ballistischer Entmagnetisierungsfaktor angeben, der strenggenommen nur im Mittelpunkt der Probe gilt (Bozorth und Chapin 1942). Da durch die Shimprozedur das äußere Feld so beeinflußt wird, daß das Feld im Inneren der Probe möglichst homogen ist, kann der ballistische Faktor mit hinreichender Genauigkeit als Faktor für das gesamte Volumen angenommen werden. (Der Betrag von N ist für Zylinder außerdem von χ abhängig; Differenzen von N können den bei Bozorth dargestellten Werten dennoch gut entnommen werden.) $\Delta\chi$ ist die Differenz der Volumensuszeptibilitäten innen und außen. Für diamagnetische Substanzen ist χ negativ. Sein Betrag hängt von der Konzentration ab. Bei molaren Konzentrationen hat er die Größenordnung 10^{-16} . Für paramagnetische Substanzen ist χ positiv und im Betrag etwa 1000 mal größer als bei gleichen Konzentrationen diamagnetischer Substanzen.

Das molekülspezifische Feld H_{cs} soll im folgenden außer acht gelassen werden. Für einen "nackten" Kern ist das lokale Feld die Summe aus dem inneren Feld und dem Lorentzfeld $1/3 H_{int} \chi_{int}$:

$$H_{int}^{loc} = H_{int} \left(1 + \frac{1}{3} \chi_{int} \right) \quad . \quad (4.43)$$

Wenn H_L das Feld im unbeladenen, das heißt luftgefüllten Meßkopf ist, gilt für das Feld H_m im mediengefüllten Probenröhrchen

$$H_m = H_L (1 - N_m (\chi_m - \chi_L)) \quad (4.44)$$

(χ_L = Suszeptibilität der Luft bzw. des umgebenden Gases).

Das lokale Feld im Medium ist

$$H_m^{loc} = H_L (1 - N_m (\chi_m - \chi_L) + \frac{1}{3} \chi_m) \quad (4.45)$$

Summanden, die Produkte der χ miteinander enthalten, werden vernachlässigt. Die durch H_m^{loc} bestimmte Lage des Signals eines Kernes im Medium ist vom Entmagnetisierungsfaktor N_m des Probenvolumens abhängig. Bei den Probenröhrchen für 15 mm- und 20 mm-Köpfe machen sich auch kleine Füllmengendifferenzen so stark in N_m bemerkbar, daß bei festem H_L die Signallage füllhöhenabhängig verschoben sein kann.

(Zur Größenabschätzung: für wässriges Medium gilt

$$\chi_m - \chi_L = -9,07 \cdot 10^{-6} - 0,37 \cdot 10^{-6} = -9,44 \cdot 10^{-6} \quad .$$

Das Röhrchen mit 13,5 mm Innendurchmesser ist z.B. mit 4 ml 30 mm hoch gefüllt, entsprechend einem N_m von 0,1 (ballistischer Wert nach Bozorth). 0,2 ml entsprechend 5 % mehr erhöht den Füllstand um 1,4 mm, N_m ist um 0,06 kleiner. $\Delta N_m \Delta \chi$ ist etwa $6 \cdot 10^{-8} \hat{=} 0,06$ ppm. Das liegt über der Punktbreite der bei den Messungen meist gewählten Spektrendarstellung; bei pH-Bestimmungen entsprechen 0,06 ppm etwa 0,15 pH-Einheiten.)

Das lokale Feld in einem im Medium befindlichen weiteren Kompartiment K mit Entmagnetisierungsfaktor N_K ist - bei Vernachlässigung des Einflusses des Glasröhrchens -

$$H_K^{loc} = H_L (1 + (N_K - N_m) \chi_m + (\frac{1}{3} - N_K) \chi_K + N_m \chi_L) \quad (4.46)$$

Für einen Standard in einer kugelförmigen Meßzelle SK gilt $N_K = N_{SK} = \frac{1}{3}$. Dann ist

$$H_{SK}^{loc} = H_L (1 + N_m (\chi_L - \chi_m) + \frac{1}{3} \chi_m) = H_m^{loc} \quad (4.47)$$

Die Kerne in diesem Standard "sehen" also stets das gleiche Feld wie die im Medium; vor allem bei variablem χ_m ist ein ideal kugelförmiger Standard deshalb der Referenzstandard der Wahl für die Bestimmung chemischer Verschiebungen.

Häufiger wird eine Kapillare parallel zum Feld verwendet. Für sie gilt $N_K = N_S = 0$. Damit ist

$$H_s^{loc} = H_L (1 + N_m (\chi_L - \chi_m) + \frac{1}{3} \chi_s) \quad (4.48)$$

Die Differenz von H_m^{loc} und H_s^{loc} ist dann

$$\Delta H_{ms}^{loc} := H_m^{loc} - H_s^{loc} = \frac{1}{3} (\chi_m - \chi_s) \quad (4.49)$$

und für den Abstand der Resonanzen von Kernen in identischer Umgebung (d.h. mit chemischer Verschiebung) in Medium und Standard gilt

$$\Delta \delta_{ms} \approx \frac{\Delta H_{ms}^{loc}}{H_L} = \frac{1}{3} (\chi_m - \chi_s) \quad (4.50)$$

Wenn die Kapillare nicht exakt parallel zum Magnetfeld steht, ist $N_s > 0$. In Gleichung (4.50) taucht dann ein zusätzlicher Summand $N_s (\chi_m - \chi_s)$ auf, der vom Winkel der Kapillare mit dem Feld abhängt. $\Delta \delta$ ist aber von N_m unabhängig; eine Kapillare ist ein geeigneter Standard auch bei unterschiedlichen Füllhöhen, solange χ_m festgehalten wird. Lageunterschiede der Kapillare fallen nicht ins Gewicht, wenn $\chi_m - \chi_s$ klein ist, was bei Verwendung wässriger Lösungen im Standard meist gilt. Standards mit Phosphorverbindungen, die in Benzol gelöst werden (Gard und Ackerman 1983) sind in üblicherweise wässrigen biologischen Proben weniger günstig.

Bei kugelförmigen Standards ist zu beachten, daß kleine Unregelmäßigkeiten der Form zu relativ großen lageabhängigen Schwankungen von N_s führen.

Für das lokale Feld im Zellinneren, bezogen auf eine Referenzkapillare gilt

$$\Delta H_{zs}^{loc} := H_z^{loc} - H_s^{loc} = H_L (N_z (\chi_m - \chi_z) + \frac{1}{3} (\chi_z - \chi_s)) \quad (4.51)$$

Die Zellen sind im Falle von *Platymonas subcordiformis* angenäherte Rotationsellipsoide mit einem Durchmesser von zum Beispiel 7 μm bei einer Länge von 12 μm (Kirst und Kramer 1981). In Längsrichtung ist N_z dann 0,21, in Querrichtung 0,39. Je nach Lage der Zellen zum Feld variiert N_z um 0,17. Die Signale eines Kernes in der Zelle können dann lageabhängig variieren um

$$\Delta\delta_z = 0,17 (\chi_z - \chi_m) \quad . \quad (4.52)$$

Da ein $\Delta\delta$ von 0,05 ppm auflösbar ist, führt ein $\Delta\chi_{zm}$ von mehr als $3 \cdot 10^{-7}$ zu einer Verbreiterung der intrazellulären Signale; diese Suszeptibilitätsdifferenz wird zum Beispiel erreicht bei Zugabe von 0,5 mM DyCl_3 zum Medium - zum Beispiel als Verschiebungsreagenz - oder bei der Anwesenheit von 0,5 mM paramagnetischer Ionen wie Mn oder Fe im Zellinneren.

Bei der Verwendung von Dysprosium-Verschiebungsreagenzien in der ^{23}Na -NMR ist $\Delta\chi_{zm}$ bei typischerweise 10 mM Dy^{3+} $59 \cdot 10^{-7}$ (siehe unten); schon aufgrund der elliptischen Form der Zellen ist das Signal des intrazellulären Na^+ dann etwa $5,9 \cdot 10^{-6} \cdot 0,17 \hat{=} 1$ ppm breit.

Bei noch längeren Zellen kann ΔN_z bei verschiedenen Orientierungen der Zellen maximal 0,5 werden. Bei abgeplatteten Zellen kann N_z zwischen 0 (flache Seite parallel zum Feld) und 1 (flache Seite senkrecht zum Feld) variieren. Gut aufgelöste Spektren erfordern in diesen Fällen eine fixierte Ausrichtung der Zellen zum Feld. (Die Riesenzellen von *Nitellopsis* werden zum Beispiel in Feldrichtung fixiert (Mimura und Kirino 1984); sie können dann als lange Zylinder mit $N_z = 0$ angesehen werden.)

4.1.3.3 Eine Methode zur Bestimmung der Suszeptibilität

Bei der Verwendung von Verschiebungsreagenzien müssen Resonanzverschiebungen durch die veränderte Suszeptibilität χ_m im Medium nach Gleichungen (4.49) und (4.51) zur Resonanzverschiebung durch die Komplexierung des beobachteten Kernes an das Reagens addiert werden. Die Suszeptibilität ist dabei im wesentlichen durch die paramagnetischen Ionen - in dieser Arbeit Dy^{3+} - gegeben. In Abbildung 4-7 ist die Verschiebung des Signals von Na^+ im Medium gegen eine Standardkapillare

als Funktion der Konzentration C_{Dy} von $DyCl_3$ im Medium dargestellt. Für den Abstand der Signale gilt nach Gleichung (4.50)

$$\Delta\delta(C_{Dy}) = \frac{1}{3} (\chi_m(C_{Dy}) - \chi_s) \quad .$$

Mit $\chi_m(C_{Dy} = 0) = \chi_s$ kann die Suszeptibilität χ_{Dy} von $DyCl_3$ in wässriger Lösung berechnet werden als

$$\chi_{Dy} = \frac{d}{dC_{Dy}} \chi_m(C_{Dy}) = \frac{d}{dC_{Dy}} 3 \Delta\delta(C_{Dy}) \quad . \quad (4.53)$$

$\Delta\delta(C_{Dy})$ ist eine lineare Funktion der Konzentration C_{Dy} . Die Steigung der Geraden ist $190 \pm 2 \text{ ppm M}^{-1}$, χ_{Dy} ist demnach $570 \pm 5 \cdot 10^{-6}$ für 1 Mol $DyCl_3$ in wässriger Lösung.

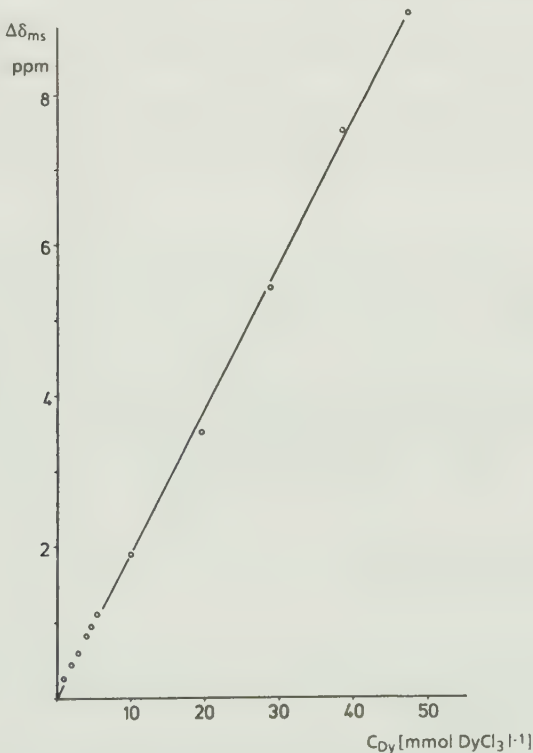


Abbildung 4-7: $\Delta\delta$ von ^{23}Na als Funktion der Menge von Dy^{3+} im Medium

Für die Bestimmung von χ nach Gleichung (4.53) genügt eine Messung, wenn χ_m ohne paramagnetische Substanz gleich χ_s im Standard ist. Andere Methoden der Suszeptibilitätsmessung mit dem NMR-Spektrometer beruhen auf dem Vergleich der Signallage der Testsubstanz mit einer Referenzsubstanz bekannter Suszeptibilität (Adams 1966) oder auf der Bestimmung der Signalintensität nach Gleichung (4.10) (Gibson und Kirk 1984).

Für paramagnetische Ionen ist χ berechenbar als

$$\chi = \mu_o N g^2 \mu_B^2 J(J+1) \frac{1}{3 kT} \quad (4.54)$$

(g = Landé-Faktor, μ_B = Bohr'sches Magneton; Kittel 1973). Bei Zimmertemperatur gilt für 1 M Dy^{3+} : $N = 6,022 \cdot 10^{-26} \text{ m}^{-3}$, $J = 15/2$, $g = 1,333$. Daraus erhält man $\chi_{Dy^{3+}} = 608 \cdot 10^{-6}$.

4.1.3.4 Linienverbreiterung durch Feldinhomogenitäten

Außer unterschiedlichen Magnetstärken in den verschiedenen Kompartimenten existieren Feldverzerrungen an den Membranen, die Feldunterschiede auch innerhalb der Kompartimente bedingen.

Das Feld im Probenvolumen ist auch bei unvollkommenem Shim zumindest lokal homogen, wenn zunächst eine klare Lösung vorliegt. Wenn im Lösungsmittel mikroskopische Kompartimente beziehungsweise Zellen suspendiert werden, die eine andere Suszeptibilität als das Medium besitzen, ändert sich das Feld in der Umgebung der Zellen. Innerhalb der Zellen ist das Feld etwas kleiner (paramagnetisches Cytoplasma) oder größer (diamagnetisches Cytoplasma) als außen, aber homogen, wenn die Zellen die Form von Ellipsoiden haben (homogenes Cytoplasma vorausgesetzt). Die Zellen wirken wie kleine Dipole, deren Feld sich dem ursprünglich homogenen Feld im Medium überlagert. In der Umgebung der Zellen ist das Feld dadurch verzerrt.

An der Zelloberfläche entspricht das Feld dem Innenfeld der Zellen, nach außen nähert es sich mit $(\chi_z - \chi_m) (r_o^3/r^3)$ dem ungestörten Feld H_m im Medium an.

$$H_m(r) = H_m \left(1 - (\chi_z - \chi_m) \left(\frac{r_o}{r} \right)^3 \right) \quad (4.55)$$

Eine im Medium befindliche Substanz erfährt also ein Feld, das um $H(\chi_z - \chi_m)$ variiert. Da das Dipolfeld mit $1/r^3$ abfällt, ist der Anteil der Kerne, die ein nahe der Zelloberfläche stark von H_m abweichendes Feld "sehen", im allgemeinen klein. Bei sehr dichter Packung der Zellen wird der Anteil der Kerne in Zellnähe relativ zur Gesamtzahl der Kerne im Medium größer. Die Linien von Substanzen im Medium können dann sehr breit werden. Besonders deutlich wird das bei großen $(\chi_z - \chi_m)$ bei Messungen mit Verschiebungsreagenzien. In Abbildung 4-8 sind Signale von ^{23}Na mit 12 beziehungsweise 9 mM DyTTHA als Verschiebungsreagenzien in zellfreiem Medium und mit circa 20 Vol % Zellen einander gegenübergestellt.

Diffusion in den inhomogenen Feldern trägt außerdem zu einer schnelleren Relaxation bei. Dadurch wird die Linienbreite zusätzlich vergrößert.

Diese Argumentation gilt analog für Kompartimente innerhalb der Zellen. Da das Cytoplasma seinerseits nicht homogen ist, ist das intrazelluläre Feld im allgemeinen gleichfalls inhomogen. Insbesondere Substanzen in der Nähe von paramagnetischen Zellbezirken - Mn- und Fe-haltige Kompartimente - sind auch im ungebundenen Zustand durch sehr breite Linien nahezu unsichtbar.

Suszeptibilitätsdifferenzen, die auf diamagnetischen Salzen beruhen, dürften im allgemeinen vernachlässigbar sein, da sie mit $\Delta\chi$ von 10^{-7} bei Konzentrationsdifferenzen von 0,1 M nur ein $\Delta\delta$ von unter 0,1 ppm bewirken. Die vermuteten Konzentrationen von organischen Osmoregulatoren wie Mannit (= Mannitol) in *Platymonas* oder Glycerin in *Dunaliella* (200 bis 300 mM Mannit (Dickson und Kirst 1986); 2 M Glycerin (Degani et al. 1985)) bewirken ebenfalls nur $\Delta\chi$ von 10^{-7} .

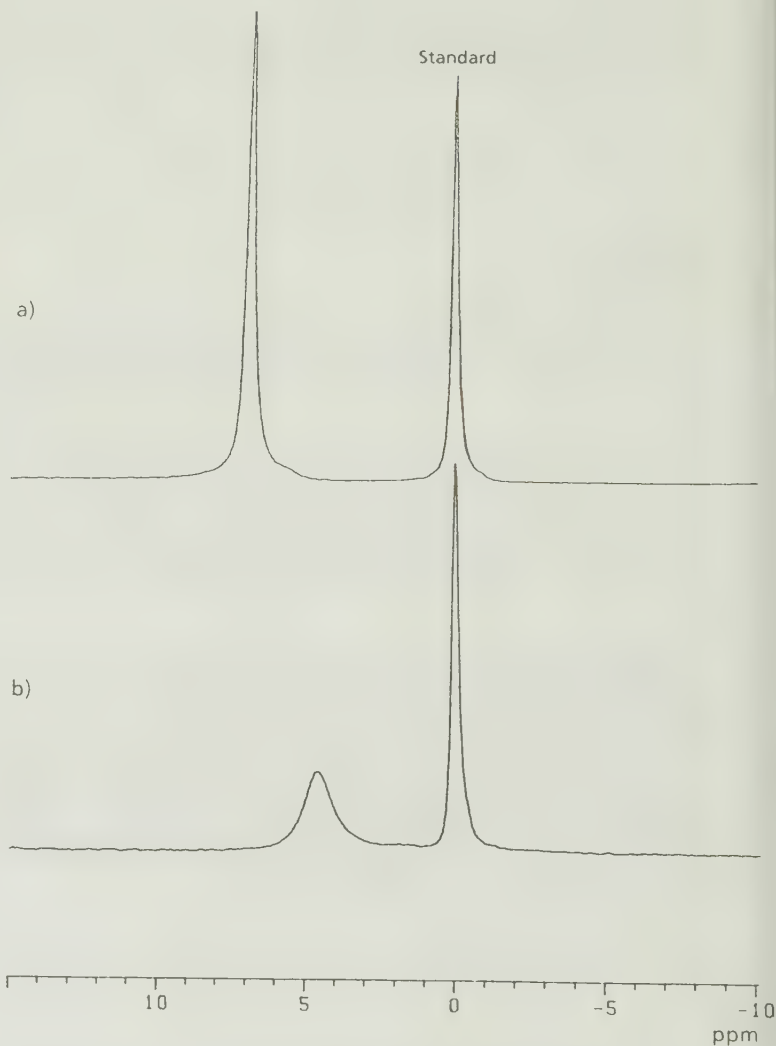


Abbildung 4-8: Linienbreiten von ^{23}Na -Spektren

- a) Probe ohne Zellen, $0,4 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl}$, $12 \text{ mmol l}^{-1} \text{ DyTTHA}$
b) Probe mit $0,4 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl}$, $9 \text{ mmol l}^{-1} \text{ DyTTHA}$, sowie ca. 20 Vol % *Platymonas*
(Standard: NaCl in konzentrischer Kapillare; 32 Scans in 15 s)

4.2. Durch NMR-Spektroskopie beobachtbare Parameter

4.2.1 Metabolitenkonzentrationen

Den aufgenommenen Spektren können im Prinzip mehrere Informationen gleichzeitig entnommen werden. Neben Art und Konzentration vorhandener meßbarer Stoffe können spezielle Informationen über das Milieu ermittelt werden, in denen gemessene Metabolite auftreten, wie pH-Wert und Ionenkonzentrationen.

Die Larmorfrequenz des Signals eines Kernes bei gegebenem Feld ist spezifisch für die chemische Bindung, in der der Kern vorliegt. Die Intensität des Signals ist nach Gleichung (4.14) in Verbindung mit Gleichung (4.8) bei voll ausrelaxierten Spektren proportional zur Zahl n der im Probenvolumen vorhandenen Kerne. Durch Vergleich mit der Signalintensität einer Probe bekannter Konzentration läßt sich die Konzentration von Metaboliten im aktiven Volumen der Probe bestimmen.

Der Standard für die chemische Verschiebung kann gleichzeitig als Referenz für Konzentrationsbestimmungen verwendet werden, indem seine Intensität gegen das Signal einer bekannten Konzentration des beobachtbaren Kernes geeicht wird. Da das Signal des Kapillarstandards stets dieselbe Schwächung erfährt wie das Signal des umgebenden Mediums, ist die Konzentrationsbestimmung auf diese Weise unabhängig von der Probenleitfähigkeit. Der Standard soll sich allerdings stets am selben Ort im Probenvolumen befinden, damit die Schwächung des B_1 -Feldes zum Spulenanfang hin das Standardsignal nicht verfälscht.

Bei einer Konzentrationsbestimmung durch Vergleich der Signale zweier verschiedener Proben ohne Verwendung eines gemeinsamen Standards müssen unterschiedliche induktive Verluste berücksichtigt werden (Kap. 4.1.2.).

Zur Bestimmung intrazellulärer Konzentrationen muß das Partialvolumen der Zellen bekannt sein. Bei Zellsuspensionen, in denen die Zellen homogen im Probenvolumen verteilt sind, kann es im allgemeinen leicht aus dem sedimentierten Zellvolumen (PCV, siehe Kap. 5.2) bestimmt werden.

Bei einer inhomogenen Verteilung von Zellen in der Probe, zum Beispiel bei Untersuchungen an Riesenzellen von Characeen, die über das aktive

Probenvolumen hinausreichen, ist eine einfache Bestimmung des Zellvolumens nicht ausreichend. Das Partialvolumen der Zellen im aktiven Volumen des Probenkopfes kann ermittelt werden, indem die Signalintensitäten einer im Medium gelösten Substanz in Anwesenheit der Zellen und nach Entfernen der Zellen verglichen werden. Das Verhältnis des Differenzsignals zum Signal des Mediums ohne Zellen gibt das Zellvolumen als Bruchteil des aktiven Probenvolumens an.

Wenn bei der Akkumulation von Spektren die Pulsabstände kleiner sind als die zum vollständigen Relaxieren des Spins notwendige Zeit von $5 \cdot T_1$, geben die Signalintensitäten in einem Spektrum im allgemeinen nicht mehr die relativen Konzentrationen gemessener Metaboliten an. Die auftretenden Sättigungseffekte müssen korrigiert werden.

Nach Ernst und Anderson (1966) kann die Magnetisierung nach einem Puls in einer Reihe äquidistanter Pulse angegeben werden als

$$M_y = M_o \frac{1 - e^{-T/T_1}}{1 - e^{-T/T_1} \cos \alpha} \sin \alpha \quad (4.56)$$

α ist der Pulswinkel, T der Abstand zweier Pulse, T_1 die longitudinale Relaxationszeit und M_o die von der Stoffmenge abhängige Magnetisierung in z-Richtung vor Beginn der Pulsfolge. Vorausgesetzt ist in Gleichung (4.56) daß - wie bei biologischen Proben im allgemeinen der Fall - T_2 klein gegen den Pulsabstand T ist.

Innerhalb eines Spektrums, das mit Pulswinkel α akkumuliert wurde, gilt demnach für die relative Intensität I einer Linie, verglichen mit I_{rel} derselben Linie in voll ausrelaxiertem Zustand - aufgenommen mit demselben α -

$$\frac{I}{I_{rel}} = \frac{1}{\xi_{T_1}} = \frac{1 - e^{-T/T_1}}{1 - e^{-T/T_1} \cos \alpha} \quad (4.57)$$

Zum Vergleich zweier Linien unterschiedlicher T_1 -Zeiten müssen die Intensitäten gemäß Gleichung (4.57) mit den Korrekturfaktoren ξ_{T_1} multipliziert werden.

Für die wichtigsten Phosphatmetaboliten sind die T_1 -Zeiten in vivo bestimmt worden (Kap. 5.). Die daraus folgenden ξ_T sind für verschiedene typische und häufig verwendete α und T in Tabelle 4-2 aufgeführt.

Tabelle 4-2: Korrekturfaktoren zur Intensitätsbestimmung

Signal	T_1	$\xi_{T_1}(\alpha; T)$							
		$\alpha = 90^\circ$		$\alpha = 70^\circ$		$\alpha = 60^\circ$		$\alpha = 42^\circ$	
		T = 1s	T = 0,5s	T = 1s	T = 0,5s	T = 1s	T = 0,5s	T = 1s	T = 0,5s
SP	0,85	1,45	2,24	1,30	1,82	1,23	1,63	1,12	1,32
P_i	0,8	1,40	2,15	1,27	1,75	1,21	1,58	1,11	1,30
PD	0,1	1,00	1,01	1,00	1,0	1,00	1,01	1,00	1,01
PEP	0,8	1,40	2,15	1,27	1,75	1,21	1,58	1,11	1,30
ATP/ADP	0,3	1,04	2,23	1,03	1,15	1,03	1,12	1,01	1,06
NAD(H)	0,5	1,16	1,58	1,11	1,39	1,09	1,30	1,05	1,15
polyP	0,008	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Die Intensitäten der Signale können als Integral über die Resonanzlinien am Spektrometer mit Standardbefehlen bestimmt werden. Unter der Annahme, daß die Linien im wesentlichen lorentzförmig sind, kann das Integral auch als Produkt von Höhe und Halbwertsbreite bestimmt werden. Wenn kleinere Signale auf der Flanke eines großen Signals liegen (z.B. das β -Signal des ATP auf dem Polyphosphat-Signal) ist diese Methode die schnellste; die auftretenden Fehler sind angesichts der bei biologischen Proben ohnehin bestehenden Meßungenauigkeiten tolerierbar (siehe Kap. 5.). Aufwendigere Verfahren zur Ermittlung der Integrale

durch Simulation überlagelter Signale ergeben vergleichbare Ergebnisse (z.B. unter Verwendung des Programms GLINFIT (Bruker 1986)).

4.2.2. Intrazelluläre pH-Werte

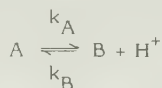
4.2.2.1 Die chemische Verschiebung als Funktion des pH

Bei vielen Säure-Base-Paaren ist die chemische Verschiebung eines individuellen Kernes im NMR-Spektrum abhängig vom Grad der Protonierung. Dies gilt zum Beispiel für die chemische Verschiebung von Phosphatgruppen. Die Bindung eines Protons an das Phosphatanion führt zu einer magnetischen Abschirmung des Phosphorkernes - sie verschiebt die Resonanz zu tieferen Frequenzen.

Der pH-Wert der Umgebung bestimmt das Verhältnis zwischen protonierter und deprotonierter Form einer Phosphatgruppe. Der Austausch zwischen beiden Formen erfolgt sehr schnell, so daß im Spektrum nur ein gemeinsames mittleres Signal beider sichtbar ist.

Dies läßt sich verallgemeinert wie ein zweiseitiger chemischer Austausch beschreiben.

Bezeichnet man die protonierte Form mit A und die deprotonierte Form mit B, so gilt für den Prozeß



mit

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t} [A] &= -k_A [A] + k_B [B] \\ \frac{\partial}{\partial t} [B] &= -k_B [B] + k_A [A] \end{aligned} \quad (4.58)$$

k_B beschreibt in diesem Fall die Protonierungsrate, die natürlich zur Protonenkonzentration $[H^+]$ proportional ist.

Für die Magnetisierung im B_0 -Feld gilt

$$\frac{\partial}{\partial t} J_A = -k_A J_A + k_B J_B \quad (4.59)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} J_B = -k_B J_B + k_A J_A$$

(J_A, J_B = Magnetisierung in der Form A, B).

Nachdem die Magnetisierung durch einen Puls in die xy-Ebene gekippt worden ist, wird sie durch die modifizierten Bloch-Gleichungen für den Austausch (J_A', J_B' im rotierenden System, $T_1 \gg T_2$) beschrieben

$$\frac{\partial}{\partial t} J_A' = -\frac{J_A'}{T_{2A}} + i(\omega_A - \omega) J_A' - k_A J_A + k_B J_B' \quad (4.60)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} J_B' = -\frac{J_B'}{T_{2B}} + i(\omega_B - \omega) J_B' - k_B J_B' + k_A J_A'$$

Wenn $|\omega_A - \omega_B| \ll k_A$ und k_B , ergibt der Absorptionsterm der Lösung eine einzige näherungsweise lorentzförmige Linie, die bei der Larmorfrequenz ω_{AB} mit

$$\omega_{AB} = p_A \omega_A + p_B \omega_B \quad (4.61)$$

zu beobachten ist. p_A und p_B sind die Besetzungswahrscheinlichkeiten von A beziehungsweise B.

Für ein Säure-Base-Gleichgewicht mit Dissoziationskonstante pK_a gilt

$$\frac{p_A}{p_B} = 10^{pK_a - pH} \quad (4.62)$$

und man erhält

$$pH = pK_a + \log \frac{\omega_B - \omega_{AB}}{\omega_{AB} - \omega_A} \quad (4.63)$$

Für die chemische Verschiebung ergibt sich

$$\delta(\text{pH}) = \frac{\delta_A + \delta_B \cdot 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}} \quad (4.64)$$

Phosphomonoester haben zwei Protonierungsstellen mit pK_1 und pK_2 ; dann gilt strenggenommen

$$\delta_{\text{PME}} = \frac{\delta_0 + \delta_1 10^{\text{pH} - \text{pK}_1} + \delta_2 10^{\text{pH} - \text{pK}_2} (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_1})}{(1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_1}) (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_2})} \quad (4.65)$$

($\delta_n \triangleq$ Verschiebung des n-fach deprotonierten Anions).

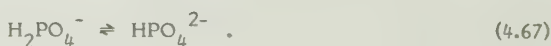
Freies Phosphat hat drei Protonierungsstellen mit pK_1 , pK_2 , pK_3

$$\delta_{\text{P}_i} = \frac{\delta_0 + \delta_1 10^{\text{pH} - \text{pK}_1} + \delta_2 10^{\text{pH} - \text{pK}_2} (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_1})}{(1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_1}) (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_2}) (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_3})} + \frac{\delta_3 10^{\text{pH} - \text{pK}_3} (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_2}) (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_1})}{(1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_1}) (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_2}) (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_3})} \quad (4.66)$$

Wenn die pK_a der verschiedenen Protonierungsstufen mehr als eine pH-Einheit auseinanderliegen, reduzieren sich diese Gleichungen jeweils auf Gleichung (4.64) mit $\delta_A \triangleq \delta_{n-1}$ und $\delta_B \triangleq \delta_n$ für pH-Werte nahe der betrachteten n-ten Dissoziationskonstante pK_n . Liegen mehrere pK_n -Werte dichter beieinander (z.B. bei Pyrophosphat), ist gegebenenfalls die vollständige Gleichung (4.65) oder (4.66) anzuwenden.

4.2.2.2 Anorganisches Phosphat als pH-Sonde

Die zweite Dissoziationskonstante für anorganisches Phosphat beschreibt den Übergang



Sie liegt bei 7,21 für Ionenstärke 0 (Gmelin 1965). Die Larmorfrequenz δ_A der protonierten Form liegt etwa 2,3 ppm ($\hat{=}$ 333 Hz bei 8,45 T) unter der Frequenz δ_B der deprotonierten Form. Die Austauschrate zwischen $H_2PO_4^-$ und HPO_4^{2-} liegt bei 10^9 bis $10^{10} s^{-1}$. Damit läßt sich das Signal von P_i im Prinzip zur Bestimmung von pH-Werten zwischen 6 und 8 benutzen. Mit

$$pH = pK_a + \log \frac{\delta_B - \delta}{\delta - \delta_A} \quad (4.63')$$

kann pH von δ abgelesen werden, wenn pK_a sowie δ_A und δ_B bekannt sind. Diese Parameter sind aber ihrerseits abhängig von der Umgebung des Phosphats, so daß die genaue Bestimmung des pH die Berücksichtigung der intrazellulären Bedingungen erfordert.

Der pK_a hängt von der Ionenstärke I ab. Für die einwertigen Ionen Na^+ und K^+ gilt nach der Theorie von Debye und Hückel

$$pK_a(I) = pK_a(I=0) - \frac{3A\sqrt{I}}{1 + 4B\sqrt{I}} \quad (4.68)$$

für den in Gleichung (4.67) beschriebenen Übergang. Bei 25 °C ist $A = 0,51$ und $B = 0,33$ (Seo et al. 1983). Für K^+ gilt Gleichung (4.68) recht genau. Na^+ verschiebt pK_a im Konzentrationsbereich bis etwa 0,3 M ($\hat{=}$ I = 0,3) um 0,1 mehr als die gleiche Menge K^+ . 5 mM P_i in bidestilliertem Wasser hat zum Beispiel einen pK_a von 7,0. 500 mM KCl erniedrigen den pK_a um etwa 0,4 (Roberts et al. 1981). Zweiwertige Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} verursachen einen weit stärkeren Effekt, der durch Gleichung (4.68) nicht beschreibbar ist. Schon 50 mM Mg^{2+} erniedrigen den pK_a um etwa 0,7 gegenüber 5 mM P_i allein, 5 mM Mg^{2+} führt zu einer Erniedrigung um 0,3. Neben elektrostatischen Effekten muß eine Komplexierung von Mg^{2+} (das gilt auch für Ca^{2+}) am Phosphat angenommen werden. Entscheidend für die pK_a -Verschiebung sind die freien Kationen: die Zugabe von Verbindungen, die ihrerseits zweiwertige Ionen komplexieren, reduzieren die Konzentration freier Ionen und entsprechend die pK_a -Erniedrigung.

Ähnliches gilt für δ_A und δ_B ; δ_A liegt bei +0,7, δ_B bei +3,2 ppm. Einwertige Ionen verschieben die Plateaus der pH-Kurve, das heißt die beiden pH-unabhängigen Bereiche der sigmoiden Kurve, zu höheren Frequenzen, und zwar um etwa 0,15 ppm für 500 mM KCl (das "basische

Plateau" δ_B wird tendenziell etwas mehr verschoben als das "saure Plateau" δ_A ; Abb 4-9). Zweiwertige Ionen im Medium verschieben die Plateaus dagegen deutlich zu niedrigeren Frequenzen, etwa 0,17 ppm bei 5 mM $MgCl_2$, 0,35 ppm bei 50 mM $MgCl_2$ (δ_A etwas weniger als δ_B). Auch dieser Effekt wird durch Mg^{2+} -komplexierende Verbindungen reduziert (Werte abgelesen aus Graphen bei Roberts et al. 1981; Größenordnung überprüft durch eigene Beobachtungen).

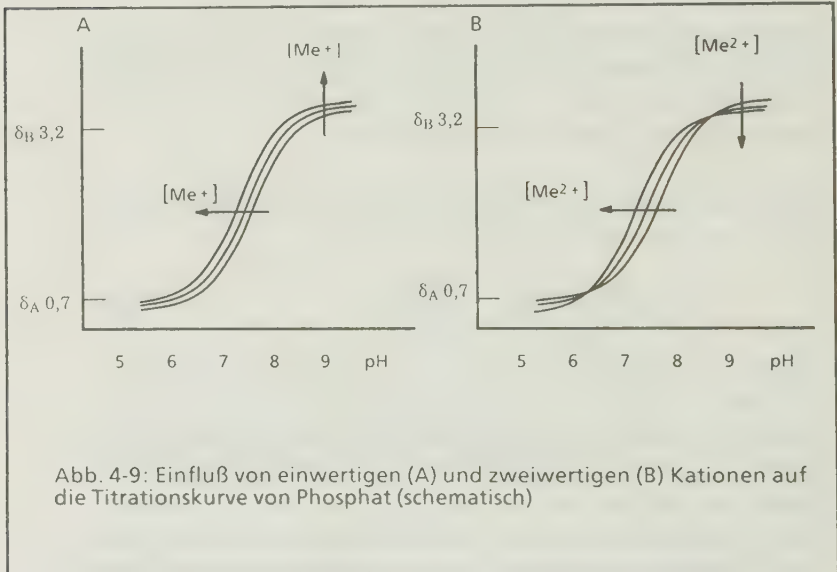


Abb. 4-9: Einfluß von einwertigen (A) und zweiwertigen (B) Kationen auf die Titrationskurve von Phosphat (schematisch)

Für Phosphomonoester ist die Änderung des pK_a etwa vergleichbar, während die Verschiebung der Plateaus zum Beispiel bei Glukose-6-Phosphat etwa doppelt so groß wie bei anorganischem Phosphat ist.

Die Temperaturabhängigkeit des pK_a liegt bei Raumtemperatur nur bei etwa 0,003 pH-Einheiten pro Kelvin (Seo et al. 1983) und kann vernachlässigt werden.

Für eine Bestimmung intrazellulärer pH-Werte muß deshalb eine Eichung in einem Milieu vorgenommen werden, das die effektiven Konzentrationen ein- und zweiwertiger Ionen sowie weiterer Stoffe, die δ mög-

licherweise beeinflussen, möglichst nachbildet. Der daraus ermittelte Absolutwert des pH weist gegebenenfalls einen systematischen Fehler auf, der von der Anpassung des pK_a abhängt. pH-Differenzen sind dagegen sehr viel genauer bestimmbar. Im steilen Bereich der pH-Kurve gilt

$$\frac{\Delta pH}{\Delta \delta} \approx 1,7 (\delta_B - \delta_A)^{-1} . \quad (4.69)$$

Für P_i ist $(\delta_B - \delta_A) \approx 2,3 \text{ ppm}$, also $\frac{\Delta pH}{\Delta \delta} \approx 0,7 \text{ ppm}^{-1}$, so daß die Genauigkeit durch die Ablesegenauigkeit $\Delta \delta$ der Frequenz eines P_i -Signals gegeben ist. Bei Annäherung an die Plateaus der Kurve fallen auch die Fehler von δ_B beziehungsweise δ_A ins Gewicht.

Unterhalb von 5 und oberhalb von 8,5 ist die Kurve $\delta(pH)$ so flach, daß eine sichere pH-Bestimmung nicht mehr möglich ist. Die erste Dissoziationskonstante von P_i liegt ungefähr bei 2, also weit unterhalb physiologischer Werte. Der Abstand $\Delta \delta$ zwischen den Plateaus von H_3PO_4 und $H_2PO_4^-$ ist außerdem sehr klein - etwa 0,15 ppm (Gadian et al. 1979), so daß P_i etwa zur Messung des externen pH in den Medien acidophiler Organismen nicht geeignet ist.

Die dritte Dissoziationskonstante liegt bei 12. Das Plateau des alkalischen PO_4^{3-} liegt 2,5 ppm über dem von HPO_4^{2-} (Gadian et al. 1979), also etwa bei +5,7 ppm.

Voraussetzung für eine genaue pH-Bestimmung ist stets eine exakte Referenzierung der chemischen Verschiebung (siehe Kap. 4.1.3.).

4.2.2.3 Methoden der Eichung

Verschiedene Methoden zur Gewinnung eines geeigneten Eichmediums sind vorgeschlagen worden. Am besten wäre eine Eichung direkt im cytoplasmatischen Milieu. Sianoudis et al. (1986b) und Mitsumori und Ito (1984) haben das Plasmalemma von *Chlorella fusca* durch Zugabe von CCCP zum Medium für Protonen durchlässig gemacht. Unter der Annahme, daß diese Behandlung gleiche pH-Werte intrazellulär wie extrazellulär bewirkt, die Ionenkonzentration im Cytoplasma jedoch nicht verändert, kann so vom cytoplasmatischen P_i direkt eine Eichkurve aufgenommen werden. Die Gültigkeit dieser Annahme läßt sich aber nur schwer überprüfen.

Martin et al. (1982) sowie Satre und Martin (1985) haben zellfreie Homogenate von Zellen höherer Pflanzen und des Schleimpilzes *Dictiostelium discoideum* durch abwechselndes Einfrieren und Auftauen erzeugt, in dem dann P_i titriert wurde. Hierbei werden aber intrazelluläre Kompartimentierungen aufgehoben; eine Berücksichtigung unterschiedlicher Ionenkonzentrationen zum Beispiel in Vakuole und Cytoplasma ist nicht möglich.

Häufiger ist die Anpassung eines künstlichen Mediums an bekannte oder vermutete Zusammensetzungen des zu untersuchenden Kompartiments (den Hollander et al. 1981, Gillies et al. 1981, Nicolay et al. 1982). Eichungen im Nährmedium (Sianoudis et al. 1985) oder in Zellextrakten (Ohmori et al. 1986) sind weniger genau, da die Ionenzusammensetzung im allgemeinen nicht mit der intrazellulären übereinstimmt.

Für die hier vorgestellten Untersuchungen an *Platymonas* ist die Eichung in einem Medium vorgenommen worden, das entsprechend bekannter Daten für die Ionenkonzentration im Cytoplasma zusammengesetzt ist (siehe Kap. 5.4).

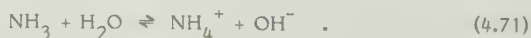
4.2.2.4 Die Bestimmung der Pufferkapazität mit NH_4Cl

Der intrazelluläre pH kann bei festem externen pH durch Zugabe von Säuren oder Basen zum Medium verändert werden, die in das Cytoplasma transportiert werden. Die alkalisierende Wirkung von NH_4Cl ist bekannt.

Das Ammonium-Ion dissoziiert im äußeren Medium teilweise zu Ammoniak und einem Proton



Als relativ kleines neutrales Molekül diffundiert NH_3 über die Plasmamembran in das Cytoplasma. Da der pK_a der Reaktion oberhalb 9 liegt, bindet NH_3 im Zellinneren bei pH 7 ein Proton, wobei ein OH^- frei wird



Durch die Freisetzung von OH^- erhöht sich pH_{int} solange, bis ein Gleichgewicht eingestellt ist, bei dem der Konzentrationsgradient von NH_3 über die Plasmamembran verschwunden ist, das heißt $[\text{NH}_3]_{\text{ext}} = [\text{NH}_3]_{\text{int}}$.

Aus dem Verhältnis der tatsächlich zu messenden Alkalisierung des Zellinneren zur Menge des durch den Einstrom von NH_3 freigesetzten OH^- läßt sich die Pufferkapazität des Zellinneren bestimmen:

$$\beta = \frac{\Delta[\text{NH}_4^+]_{\text{int}}}{\Delta\text{pH}_{\text{int}}} = \frac{[\text{NH}_4\text{Cl}] \cdot 10^{-\text{pH}_{\text{ext}} - \text{pH}_{\text{int}}}}{\Delta\text{pH}_{\text{int}}} \quad (4.72)$$

mit $[\text{NH}_4^+]_{\text{int}} = [\text{NH}_3]_{\text{int}} \cdot 10^{-\text{pK}_a - \text{pH}_{\text{int}}}$, $[\text{NH}_3]_{\text{int}} = [\text{NH}_3]_{\text{ext}}$,

$[\text{NH}_3]_{\text{ext}} \approx [\text{NH}_4\text{Cl}]_{\text{total}} \cdot 10^{\text{pH}_{\text{ext}} - \text{pK}_a}$;

angenommen ist $\text{pK}_{a(\text{int})} = \text{pK}_{a(\text{ext})}$.

pH_{int} ist der gemessene intrazelluläre pH nach Zugabe von NH_4Cl zum Medium und $\Delta\text{pH}_{\text{int}}$ ist die Differenz der intrazellulären pH-Werte vor und nach Zugabe von NH_4Cl . Dann ist β die totale Pufferkapazität, die Pufferung im engeren Sinne (ohne die Wirkung des $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Puffers selbst) und pH Regulierung durch Stoffwechselvorgänge umfaßt (Roos und Boron 1981).

Wenn statt der passiven Diffusion von NH_3 ein aktiver Transport von NH_4^+ in das Cytoplasma stattfindet, würde eine Ansäuerung des Zellinneren als Folge des Ablaufs der Reaktion (4.71) von rechts nach links stattfinden.

4.3 Verbindungstypen im Phosphatspektrum

Die Signale von Metaboliten des Phosphatstoffwechsels liegen zwischen +6 ppm und -30 ppm. Eine einfache Beziehung zwischen Strukturen und chemischer Verschiebung kann nicht angegeben werden. Ein Zusammenhang zwischen magnetischer Abschirmung des Kernes und dem jeweils kleinsten Winkel zwischen den Bindungen zweier Sauerstoffatome an das Phosphoratom ist phänomenologisch darstellbar (Gorenstein 1984).

Im Unterschied zu ^1H - und ^{13}C -Spektren ist die Zuordnung von Resonanzlinien des ^{31}P -Spektrums zu einzelnen Verbindungen dadurch vereinfacht, daß die Zahl verschiedener phosphorylierter Verbindungen, die in NMR-detektierbarer Form (Mobilität!) und Konzentration vorkommen, relativ gering ist. Die aufgenommenen Spektren sind daher recht einfach. Homonukleare Kopplungskonstanten liegen typischerweise unter 20 Hz, so daß sie in vivo nicht aufgelöst werden. Die einzelnen Metaboliten können deshalb meist nicht einfach anhand typischer Linienaufspaltungen identifiziert werden, sondern nur durch ihre chemische Verschiebung.

Es liegen Tabellen für die chemischen Verschiebungen vieler Phosphatmetabolite vor, die in verschiedenen biologischen Systemen gemessen worden sind (Burt et al. 1979, Bárány und Glonek 1984, Sianoudis 1986, Navon et al. 1977, Shaw 1983). Für den Einzelfall können diese Tabellen aber nur einen ersten Anhaltswert geben, da die chemische Verschiebung der meisten Metabolite gerade im physiologischen Bereich sehr stark vom pH und von Ionenkonzentrationen abhängt. Die Regionen des Spektrums lassen sich aber - auch bei physiologischen pH-Werten von 7 $\pm$ 0,5 - typischen Phosphorverbindungsklassen zuordnen (Tab. 4-3).

Eine genauere Zuordnung von Signalen ist in Zellextrakten möglich. Da die Linien durch Aufhebung der Zellkompartimentierung schärfer sind, können einige Di- und Triphosphatverbindungen an typischen Kopplungsmustern erkannt werden. Mit Protonenentkopplung lassen sich Linien vor allem im Phosphomonoesterbereich durch Aufhebung der Kopplung mit Protonen im Zuckerrest weiter verschmälern. Gerade in dieser Region liegen die Signale mehrerer Metabolite sehr nahe beieinander, so daß eine größere Sicherheit bei der Zuordnung einer Linie zu einer Substanz

Tabelle 4-3: Verbindungstypen im Phosphatspektrum

Verbindungs-kategorie	δ bei pH 7	Verschiebung abhängig von		Struktur
		pH	Komplex mit Me^{2+}	
Monoester	3,5 ... 5,5	ja	gering	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ -\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{O}^- \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{O}^- \end{array}$
freies Phosphat	2,3 ... 2,8	ja	gering	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{O}^- - \text{P} - \text{O}^- \\ \\ \text{O}^- \end{array}$
Aldose - 1 - Phosphate	2,3 ... 2,8	ja	gering	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{O}-\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{O}^- \\ \quad \\ -\text{C} \quad \text{H} \\ \quad \end{array}$
Diester	-1,5 ... + 1,0	nein	nein	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{C}- \\ \quad \quad \end{array}$
Phosphoenolpyruvat	0,3	(ja)	gering	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{O}^- \\ \quad \\ \text{C} \quad \text{O}^- \\ \diagup \end{array}$
Phosphoamidate	-3,3 ... -2,3	nein	gering	$\begin{array}{c} \text{N} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ -\text{C}-\text{N}-\text{P}-\text{O}^- \\ \quad \\ \text{NH} \quad \text{O}^- \end{array}$
allg. Polyphosphat-Terminale	-8,5 ... -4,5	ja	stark	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \quad \\ -\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{O}^- \\ \quad \\ \text{O}^- \quad \text{O}^- \end{array}$
allg. Polyphosphat-Estergruppen	-13 ... -9,5	gering	teilweise	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ -\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}- \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{O}^- \quad \text{O}^- \quad \text{O}^- \end{array}$
allg. Polyphosphat-Mittelgruppen	-23 ... -17	nein (ja bei Präterminalen)	stark	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ -\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}- \\ \quad \quad \\ \text{O}^- \quad \text{O}^- \quad \text{O}^- \end{array}$

nur zu erzielen ist, indem die zu testende Substanz dem Extrakt hinzugefügt - annähernd in der Konzentration wie bereits im Extrakt vorhanden - und ein weiteres Spektrum aufgenommen wird (Standardaddition). Da die chemische Verschiebung bei pH 8 bis 8,5 kaum noch pH-abhängig ist, kann durch Vergleich mit bekannten Verschiebungen in diesem pH-Bereich eine Vorauswahl erfolgen.

Hier sind insbesondere Tabellen hilfreich, die chemische Verschiebungen bei pH 8 oder darüber angeben (Navon et al. 1977, Bárány und Glonek 1984) oder Titrationskurven, denen man die entsprechenden Werte entnehmen kann (Gadian et al. 1979, Navon et al. 1979, Sianoudis 1986). Die zum Teil ebenfalls angegebenen pK_a -Werte streuen jedoch wegen der unterschiedlichen Ionenkonzentrationen sehr stark. Allgemein ist zu beachten, daß δ in der Literatur manchmal auf PCr als Standard bei 0 ppm bezogen wird; außerdem liegen δ , die in Elektromagneten gemessen worden sind, um ca. 0,8 ppm unter denen in supraleitenden Magneten.

Zu den Monoestern zählen vor allem die Zuckerphosphate, darunter Hexose- und Triosephosphate, aber auch Pentosephosphate, die im Calvin-Zyklus als Zwischenprodukte auftreten. Auch die Signale von Adenosinmonophosphat und das Monophosphat von NADP liegen hier. Die Monoester haben zwei Dissoziationskonstanten bei 1 und zwischen 5,5 und 6,5. Die Verschiebungsdifferenz Δ_δ zwischen pH 5 und pH 8 ist etwa 4 ppm. Die Lage der pK_a wird durch divalente Ionen in physiologischen Konzentrationen um weniger als eine pH-Einheit verschoben.

Aldohexose-1-Phosphate (δ ist bekannt für Glukose-1-Phosphat, Mannose-1-Phosphat und Galaktose-1-Phosphat) liegen abweichend von den anderen Monoestern zwischen pH 7 und 8 in der Nähe des freien Phosphats. Ihr pK_a und Δ_δ entspricht jedoch mit $\sim 6,2$ und $3,5$ ppm dem der anderen Zuckerphosphate. In Tabelle 4-4 sind chemische Verschiebungen einer Reihe von Monoestern aufgelistet.

Das freie Phosphat verschiebt sich pH-abhängig mit einem pK_a von etwa 6,7 (in vivo und in Extrakten). Die Beeinflussung des pK_a -Wertes durch die Ionenstärke einwertiger Ionen im Milieu ist beschreibbar durch die Theorie von Debye und Hückel; zweiwertige Kationen haben einen deutlich stärkeren Effekt, so daß sich der pK_a unter physiologischen Bedingungen bis etwa 6,3 verschieben kann. Δ_δ ist etwa 2,5 ppm.

Tabelle 4-4: Phosphomonoester: δ bei pH > 8

Verbindung	Bidest	Extrakt	Quelle
FbP (1-P) (α)	n	5,35 - 5,4	1
Mt1P	5,45	5,40	2
DHAP (hydr)	5,35	5,22	1, 4
dG6P	5,1	n	3
G6P(β)	5,0	5,05 - 5,10	1, 3, 4, 5
Gal6P	5,05	5,10	5
GA3P	4,87 - 4,98	5,0	3, 4
F1P	4,85	4,9 - 5,1	2
Ma6P	4,75	4,75	2
Gly1P	4,80	4,99	4, 5
3PG	4,5 - 4,8	4,8	3, 4
Rib5P	n	4,54	5
FbP (1-P) (β)	4,56	4,54 - 4,7	1, 3, 4
F6P	4,40 - 4,48	4,44 - 4,6	5
FbP (6-P) (β)	4,40 - 4,46	4,56 - 4,44	3, 4
DHAP (frei)	4,35 - 4,40	4,35	5
FbP (6-P) (α)	n	4,33	1, 3, 4
Gly2P	4,40	n	3, 4
AMP (sowie IMP, XMP)	4,28 - 4,33	4,40 (+ 0,5)	1, 3, 4 1,4
NADP	n	4,25	1
2PG	3,95 - 4,25	4,20	4
PCh	n	3,85 - 4,0	3, 4, 5
P _i	3,1	3,1 - 3,2	5
G1P	2,92	3,0	3, 4
Gal1P	2,92	2,85	5
Ma1P	n	2,50	2

n: δ nicht gemessen

Bidest: Messung der in Bidest gelosten Substanzen, das heißt bei niedrigen Ionenkonzentrationen (I = 0,01)

Extrakt: Messung der Substanz im Perchlorsäure-Extrakt oder unter Bedingungen mit hoher Ionenkonzentration (I = 0,2...0,4)

Quelle: 1. Navon et al. 1977, Navon et al. 1979 (pH-Kurven)
 2. Eigene Messungen (pH-Kurven im Anhang 4)
 3. Sianoudis 1986 (pH-Kurven)
 4. Gadian et al. 1979 (pH-Kurven)
 5. Bárány und Glonek 1984 (Tabelle)

Alle Daten in Tabelle 4-4 bezogen auf 85 % H₃PO₄ im supraleitenden Magneten.

Diester treten meist in Phospholipiden auf. Sie haben eine Dissoziationskonstante zwischen 1 und 2, so daß sie unter physiologischen Bedingungen pH-unabhängig sind. In Fällen, in denen ein spezielles Diestersignal gut erkennbar ist, kann es daher als interner Standard verwendet werden (z.B. Glycerophosphorylcholin: Navon et al. 1979, Nicolay et al. 1982). Im allgemeinen zeigen membrangebundene Phospholipide wegen ihrer Immobilität stark verbreiterte Signale. Phosphoenolpyruvat ist ein Sonderfall der Monoester und liegt ebenfalls bei 0 ppm; es hat einen pK_a von ungefähr 6.

Phosphoamidate enthalten eine an ein Stickstoffatom gebundene Phosphorylgruppe. Physiologisch bedeutsam sind die Phosphagene Phosphokreatin (PCr) in den meisten tierischen Geweben und Phosphoarginin (PArg) in einer Reihe niederer Organismen. Mit einem pK_a von etwa 4,6 ist ihr Phosphorsignal im physiologischen Bereich nicht pH-abhängig, so daß vor allem PCr als interner Standard verwendet wird (Gadian et al. 1979, Hollis 1980).

Unter allgemeinen Polyphosphaten werden in Tabelle 4-3 alle Verbindungen zusammengefaßt, die zwei oder mehr aneinander gebundene Phosphatreste enthalten. Darunter fallen Pyrophosphat (als kürzestes Polyphosphat mit zwei identischen Phosphatresten) und längere Phosphatketten sowie Ester von Pyrophosphat und Triphosphat, also - in diesem Abschnitt - nicht nur anorganisches Polyphosphat. Zu den Polyphosphat-Terminalen gehören die terminalen Gruppen der anorganischen Polyphosphate einschließlich beider Reste des Pyrophosphats sowie die γ -Gruppe der Nukleosidtriphosphate und die β -Gruppe der -diphosphate. Ihre Signale sind wie die der Monoester stark pH-abhängig - die pK_a -Werte liegen in destilliertem Wasser bei 5,5 bis 6,5 mit einem $\Delta\delta$ von 4 ppm. Die Polyphosphate komplexieren mit zweiwertigen Ionen (intrazellulär vor allem Mg^{2+} und Ca^{2+}), wodurch die pK_a sehr stark zum Säuren verschoben werden.

Protonenaustauschvorgänge an den benachbarten Phosphatgruppen wirken sich ebenfalls auf δ aus. Insbesondere beim Pyrophosphat und beim Triphosphat ergeben sich pH-Kurven mit mehreren eng beieinanderliegenden pK_a . Durch Mg^{2+} -Komplexierung rücken sie so eng zusammen, daß die pH-Abhängigkeit wie eine einzige Sigmoid mit einem (totalen) $\Delta\delta$ von 5 ppm aussieht. Bei festem pH um 7 führt eine Mg^{2+} -Komple-

xierung zu einer Hochfeldverschiebung des Signals von bis zu 2 ppm.

Polyphosphat-Estergruppen sind terminale Phosphate, die mit einem organischen Rest verestert sind. Zum einen gehören hierzu die α -Phosphate der Nukleosiddi- und -triphosphate, zum anderen auch die Pyrophosphatdiester wie NAD^+ , NADP^+ und UDPG. Diese Phosphatgruppen haben jeweils ein saures Proton mit einem pK_a um 1. Im physiologischen Bereich ist die Verschiebung von Pyrophosphatdiestern pH-unabhängig, die anderen Estergruppen werden durch den Protonenaustausch von Nachbargruppen etwas beeinflusst. Der pK_a entspricht dem der terminalen Gruppe, Δ_δ ist mit ungefähr 0,5 ppm recht klein. Komplexierung von zweiwertigen Kationen führt zu einer geringen Hochfeldverschiebung.

Polyphosphat-Mittelgruppen sind die nichtterminalen Phosphatreste der anorganischen Polyphosphate sowie das β -Phosphat des Nukleosidtriphosphates. Sie haben ein saures Proton mit niedrigem pK_a um 1. Die einem terminalen Phosphat benachbarten präterminalen Gruppen zeigen dennoch eine pH-Abhängigkeit, die parallel zu der des terminalen Phosphats verläuft. Die Shiftamplitude Δ_δ liegt bei 3 ppm für die einem terminalen Phosphat unmittelbar benachbarte Gruppe und unter 2 ppm für die darauf folgende Gruppe.

Die Lage der mittleren Gruppen von längerkettigen Polyphosphaten und ringförmiger Metaphosphate, die ebenfalls als Mittelgruppen angesehen werden können, ist oberhalb pH 2 konstant. Die Signallagen sind jedoch alle sehr stark von der Komplexierung mit zweiwertigen Ionen abhängig. Die Richtung der Verschiebung der Signale ist für die verschiedenen Gruppen je nach pH und Ionenkonzentration unterschiedlich. Der Betrag kann 4 ppm erreichen (siehe Anhang 3).

5. ^{31}P -Untersuchungen an der Alge *Platymonas subcordiformis*

5.1 Einführung: Cytologie von *Platymonas*

Platymonas subcordiformis ist eine Mikroalge der Klasse Prasinophyceae, die in Ästuaren und Küstengewässern anzutreffen ist. Ihre Lebensfähigkeit in Umgebungen mit stark wechselnden Eigenschaften läßt sie als geeigneten Organismus zur Untersuchung von Anpassungsmechanismen an veränderliche Lebensbedingungen erscheinen. Unter Hinblick auf ihr Vorkommen im Tidebereich von Ästuaren mit wechselnder Salinität des Milieus ist insbesondere die Anpassung von *Platymonas* an unterschiedliche osmotische Bedingungen untersucht worden, wobei Ionenkonzentrationen (Kirst 1977a, 1977c, Dickson und Kirst 1986), Volumenregulationen (Kirst 1977b, Kirst und Kramer 1981, Dickson und Kirst 1986), Phosphataufnahme (Kirst 1980a) und Akkumulation organischer Verbindungen zum Ausgleich osmotischer Druckschwankungen (Kirst 1980b, Dickson und Kirst 1986, Richter und Kirst 1987) besondere Beachtung fanden.

Eine elektromikroskopische Aufnahme von *Platymonas subcordiformis* wird in Abbildung 5-1 gezeigt (Kramer und Kirst, unveröffentlicht). Die Zellen besitzen die Form eines länglichen, etwas abgeflachten Ellipsoids, an dessen einem Ende vier Flagellen aus einer Einkerbung hervortreten. Die abgebildete Zelle ist etwa 11 μm lang und 6,5 μm breit. Unter den unten dargestellten Anzuchtbedingungen liegen typische Zellvolumina bei $440 \cdot 10^{-15}$ l (interpoliert nach Daten von Dickson und Kirst (1986)). Damit korrespondiert eine Plasmalemmafläche von $\sim 2,8 \cdot 10^{-10}$ m^2 (wenn vereinfacht eine kugelförmige Zelle angenommen wird).

Platymonas besitzt keine Zellwand, sondern eine sogenannte Theca, die aus Schuppen von organischem Material besteht, welche in eine ebenfalls organische Matrix eingebettet sind. Sie ist im wesentlichen aufgebaut aus Galaktose, Arabinose und Galakturonsäure, wobei Ca^{2+} als Gegenion dient. Die Elastizität der Theca erlaubt der Zelle anzuschwellen oder zu schrumpfen, so daß sie auf Änderungen des osmotischen Drucks durch Volumenänderung reagieren kann (Osmometerverhalten). Bei hohem Druck nähert sich das Zellvolumen asymptotisch dem "nicht-osmotischen Volumen" an, das von den in der Zelle befindlichen festen

Bestandteilen bestimmt wird. Die Differenz zwischen nichtosmotischem und totalem Volumen ist das osmotische Volumen. Es ist ein Maß für den von wässrigen Lösungen ausgefüllten Raum der Zelle. Bei einem Zellvolumen von $440 \cdot 10^{-15}$ l liegt das osmotische Volumen bei $160 \cdot 10^{-15}$ l, während auf das nichtosmotische Volumen $280 \cdot 10^{-15}$ l entfallen.

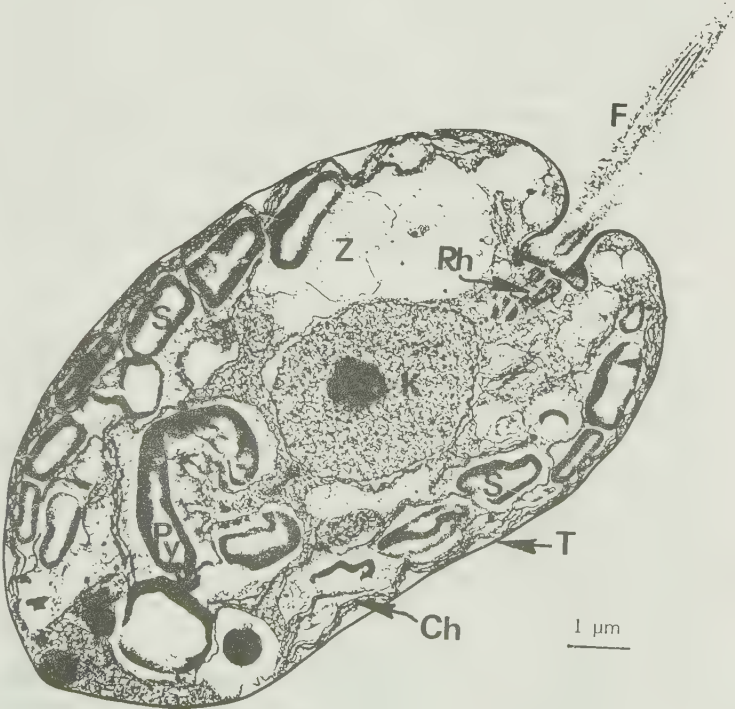


Abbildung 5-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Platymonas subcordiformis* (K: Zellkern, Ch: Chloroplast (andeutungsweise sichtbar), S: Stärkekörnern (in den Chloroplasten eingelagert) Py: Pyrenoid, F: Flagelle (nur eine Flagelle in Schnittebene ist sichtbar) Rh: Rhizoid (angeschnitten sichtbar), Z: Zisterne (vermutlich vergrößert durch osmotischen Schock vor der Fixierung), T: Theca und Plasmalemma, Mitochondrien sind in der Abbildung nur schlecht erkennbar)

Große Vakuolen sind in *Platymonas* nicht vorhanden. Nach einem hypoosmotischen Schock sind im Zellinneren zwar mehrere vakuolenartige Zisternen zu erkennen, die möglicherweise an der Volumenregulation beteiligt sind, unter Normalbedingungen machen diese Zisternen, die vom Golgi-Apparat auszugehen scheinen und vermutlich Material zum Aufbau der Theca enthalten, nur etwa 6 % des Zellvolumens aus. Typische Eigenschaften von Vakuolen, wie saurer pH bei einer relativ hohen Phosphatkonzentration, konnten in den an *Platymonas* aufgenommenen Spektren nicht festgestellt werden.

Eine Algenzelle besitzt einen großen Chloroplasten, der becherförmig das Zellinnere umschließt. Er füllt etwa 48 ± 10 % des Volumens aus. In ihm sind deutlich erkennbare Stärkekörner eingelagert. Auf einen Pyrenoid (= Stärkebildungszentrum) entfallen 13 ± 4 %. Stärkekörner und Pyrenoid sind dem nichtosmotischen Volumen zuzurechnen. Sein Volumenanteil steht für Stoffwechselprozesse in wässriger Phase nicht zur Verfügung.

Die Mitochondrien sind klein, auf sie entfallen nur etwa 3 % des Volumens. Das Cytoplasma im engeren Sinn nimmt etwa 22 ± 10 % ein, der Zellkern 8 ± 4 % (Kirst und Kramer 1981).

Die Flagellen sind mit einem kräftig ausgebildeten sogenannten Rhizoplasten verbunden, der durch Kontraktion und Entspannung den Flagellenschlag hervorruft (Salisbury und Floyd 1978, siehe auch Kap. 5.5.1.3). Die Alge besitzt außerdem einen purpurfarbenen Augenfleck und zeigt eine positive Phototaxis im Licht.

Optimales Wachstum erfolgt bei einem pH von 8,3 in künstlichem Seewasser (Richter 1987). Bei *Platymonas* sp. wurde die verstärkte Bildung von Zysten beobachtet, wenn die Zellen über eine Woche externen pH über 9,5 ausgesetzt waren (Tanoue und Aruga 1975).

5.2 Kultivierung von *Platymonas subcordiformis* und Vorbereitung der Probe für spektroskopische Untersuchungen

Platymonas subcordiformis Hazen 161-1a (Algenkulturzentrums Göttingen) wurden in modifiziertem ASP-Medium (Artificial Seawater Provasoli) kultiviert (siehe Tab. 5-1).

Angezogen wurde das Algenmaterial in einem Biostat (B. Braun Melsungen AG) im Dauerlicht ($9 - 10 \text{ W m}^{-2}$) auf der Oberfläche des Kulturgefäßes (10 Liter)) bei $23 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$. Begast wurden die Algen mit Luft (12 l min^{-1}). Alle zwei Tage wurden 2 bis 3 l Algen aus dem Biostat geerntet und frisches Nährmedium hinzugefügt.

Tabelle 5-1: Modifiziertes ASP-Medium für *Platymonas subcordiformis*

Substanz	Konzentration	je Liter	
NaCl	0,40 mM	23,6 g	Makro- Elemente  
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	24 mM	6 g	
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	22 mM	4,5 g	
KCl	8,0 mM	0,6 g	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	2,7 mM	0,4 g	
KNO ₃	2,0 mM	0,2 g	
Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	0,044 mM	12,5 mg	
KH ₂ PO ₄	0,15 mM	20 mg	Mikro- Elemente  
Na ₂ · EDTA	29,2 µM	10 mg	
ZnCl ₂	0,37 µM	50 µg	
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,004 µM	1,0 µg	
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,002 µM	0,4 µg	
H ₃ BO ₃	32,3 µM	2 mg	
FeCl ₂ · 4H ₂ O	0,5 µM	0,1 mg	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	2,0 µM	0,4 mg	
+ Vitamin 8 Mix			

Algen, die für Messungen vorgesehen waren, wurden - soweit nicht anders angegeben - zwei Tage vorher durch Zentrifugation geerntet (400 g, 2,5 min), einmal mit frischem Nährmedium gewaschen und in Medium

mit reduziertem Phosphatgehalt ($0,03 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$) und reduziertem Gehalt an paramagnetischen Ionen ($0,05 \text{ }\mu\text{M MnCl}_2$ und $0,01 \text{ }\mu\text{M FeCl}_2$) resuspendiert. Die Algensuspension wurde auf $\sim 3 \cdot 10^6 \text{ Zellen ml}^{-1}$ verdünnt und in Kulturröhrchen (circa 250 ml Fassungsvermögen) überführt. In einer Anzuchtanlage wurden sie bei $23^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ mit Luft begast und im Licht-Dunkel-Wechsel 14:10 h (Beleuchtung: 8 W m^{-2}) weiter kultiviert.

Zur Durchführung von Messungen wurde der Inhalt von zumeist zwei Kulturröhrchen zusammengeführt und sein Volumen gemessen (im allgemeinen etwa 450 - 500 ml). An einem Aliquot von 5 ml wurde das gepackte Zellvolumen (packed cell volume, PCV) bestimmt. Hierzu wurde die Probe in konischen Gefäßen mit einer gegen μl kalibrierten Gardierung 1 min lang bei 5.000 g zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen stellen 80 % des PCV intrazelluläres Volumen dar, 20 % entfallen auf den extrazellulären Raum (Dickson und Kirst 1986). Aus PCV und Suspensionssvolumen wurde das Zellvolumen der gesamten Probe ermittelt. Für ^{31}P -Spektroskopie war jeweils ein Zellvolumen von etwa 800 μl notwendig.

Die Algen wurden daraufhin abzentrifugiert (400 g, 2 min) und zweimal in 0,4 M NaCl gewaschen. Die letzte Zentrifugation erfolgte mit 115 g über 10 min. Das Pellet wurde zu einer Probe von 5 ml im Meßmedium resuspendiert und in das NMR-Meßröhrchen von 15 mm Außendurchmesser überführt.

Das Meßmedium entspricht dem Kultivationsmedium ohne Phosphat und Makroelemente. In Einzelfällen wurde zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses die NaCl-Konzentration auf 10 mM verringert. Die Osmolarität wurde in diesen Fällen durch Zugabe von 0,66 M Sorbit wieder auf den für Seewasser typischen Wert von $800 \cdot \text{mosmol kg}^{-1}$ eingestellt (kontrolliert mit einem Osmometer Wescor 5100 B (vapor pressure)). Der pH der Probe wurde mit NaOH/HCl auf 8 eingestellt. 10 mM HEPES-Puffer reichten aus, um den externen pH der Probe stabil zu halten.

Unterschiede zwischen ^{31}P -Spektren, die in Medien mit normaler und mit reduzierter NaCl-Konzentration aufgenommen wurden, konnten nicht festgestellt werden.

5.3. Die Versorgung der Probe während der Messung

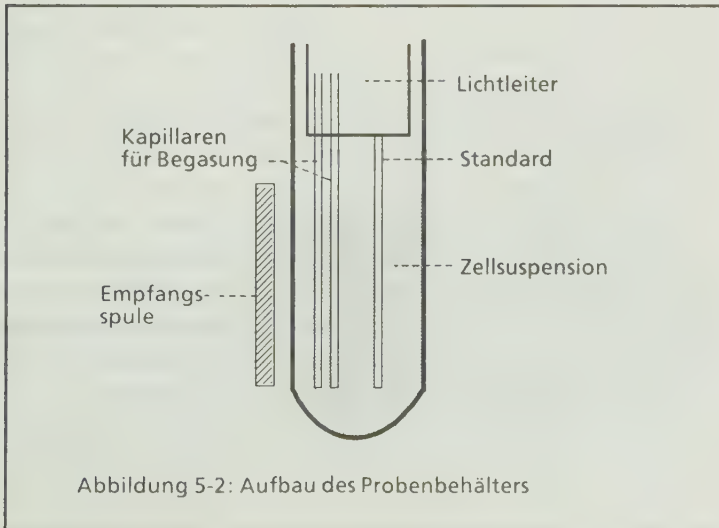
5.3.1 Der Probenbehälter

Untersuchungen des Phosphatmetabolismus von *Platymonas* wurden im allgemeinen in 15 mm-Probenröhrchen durchgeführt, die mit 5 ml Algensuspension gefüllt waren. Das Zellvolumen der Algen betrug um 0,8 ml, das intrazelluläre Partialvolumen der Suspension ist somit etwa 16 %. Bei einem durchschnittlichen Zellvolumen von $440 \cdot 10^{-12}$ ml unter den gegebenen Anzuchtbedingungen entspricht das etwa $3,6 \cdot 10^8$ Zellen ml^{-1} , das heißt $1,8 \cdot 10^9$ Zellen in der Probe.

Diese hohe Zelldichte bewirkt einen schnellen Verbrauch des im Medium gelösten Sauerstoffs. Für Messungen unter aeroben Bedingungen muß die Probe daher während der Messung mit Sauerstoff versorgt werden.

Auch die Belichtung der Probe wird durch die Zelldichte behindert. Licht wird von der Suspension schon unmittelbar unter der Oberfläche vollständig absorbiert. Für Belichtungsexperimente muß daher durch geeignete Maßnahmen eine homogene Belichtung der Zellen sichergestellt werden.

Das Probenröhrchen ist für diesen Zweck wie in Abbildung 5-2 dargestellt aufgebaut.



Zwei Glaskapillaren (0,5 - 1 mm Durchmesser) führen durch die Suspension hindurch bis auf den Boden des Röhrchens. Durch eine Kapillare wird Luft oder Sauerstoff in die Zellsuspension geleitet, wenn aerobe Bedingungen gefordert sind. Wenn Messungen unter anaeroben Bedingungen erfolgen sollen, wird durch die Kapillare N_2 oder ein N_2/CO_2 -Gemisch geleitet. In einer weiteren beidseitig versiegelten Kapillare befindet sich die als Referenz dienende Lösung von MDP.

Für Belichtungsexperimente wird von oben ein Lichtleiter mit 8 mm Faserbündeldurchmesser bis unmittelbar über die Oberfläche der Suspension geführt. Außerhalb des Magneten wird der 1,2 m lange Lichtleiter (Typ P 8, Fiber Optics) an eine Lichtquelle (150 W Halogen) angeschlossen.

5.3.2 Gasversorgung für anaerobe und aerobe Bedingungen

Um zu verhindern, daß die Algen während der Messung sedimentieren und sich dadurch unterschiedliche Lebensbedingungen in verschiedenen Bereichen der Probe ausbilden, wird bei Versuchen unter anaeroben Bedingungen Stickstoff in die Probe geleitet. Bei Versuchen unter aeroben Bedingungen erfolgt die Verwirbelung der Probe durch die eingeleitete Luft. Da die Zellen sich nur sehr langsam absetzen, reichen zum Aufwirbeln der Probe bereits kleinste Gasströmungen.

Getrennte Kapillaren für Stickstoff und Sauerstoff sind notwendig, um schnell zwischen anaeroben und aeroben Bedingungen wechseln zu können. Die notwendigen langen Anschlußschläuche haben erhebliche Totvolumina, so daß bei einem Begasungswechsel erst nach einiger Zeit das restliche jeweils vorher benutzte Gas ausgetrieben worden ist, wenn nur kleine Durchflußraten verwendet werden.

Die Begasung kann kontinuierlich oder gepulst erfolgen (Ogawa et al. 1978). Kontinuierliche Begasung, bei der sich Gasblasen auch während der Aufnahme des FID im Probenvolumen befinden, führt bei Durchflußraten unter etwa $40 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ zu keiner feststellbaren Signalverschlechterung durch Linienverbreiterung. Bei dieser Begasungsart können zum Beispiel Pulsrepetitionszeiten von 0,5 s gewählt werden.

Bei gepulster Begasung wird ein Magnetventil durch das Spektrometer so gesteuert, daß während des Pulses und der nachfolgenden Datenakquisition keine Gasblasen in der Probe sind. In den hier beschriebenen Experimenten sind bei gepulster Begasung meist höhere Durchflußraten von $\geq 100 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ verwendet worden. Die notwendige Wartezeit, bis nach Schließen des Ventils alle Gasblasen aus der Probe entwichen sind, erlaubt Pulsrepetitionszeiten von nicht unter einer Sekunde. Das Ventil ist dann jeweils etwa 0,4 s geschlossen.

An einem Probenkammermodell, in dem am Boden des Röhrchens eine Sauerstoffelektrode (YSI 5331, Yellow Springs) angebracht war, wurde die Sauerstoffsättigung der Probe für beide Begasungsarten überprüft.

Die Sauerstoffzehrung betrug - an einer typischen Probe gemessen (940 μl PCV) - etwa $2,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Da bei kontinuierlich belüfteten Proben die O_2 -Konzentration in der Suspension etwa 5 bis 6 mg l^{-1} betrug, wäre die Probe erst etwa zwei Minuten nach dem Ende der Luftversorgung anaerob. Die kurzfristige Begasungsunterbrechung von unter einer Sekunde bei der gepulsten Luftversorgung bewirkt daher keine Sauerstoffverarmung.

Durch Umschalten der Begasung von Luft auf Stickstoff wird der Restsauerstoff erheblich schneller aus dem Medium ausgetrieben. Bei N_2 -Durchflußraten von ca. 100 ml min^{-1} (gepulste Begasung) ist die Probe in circa einer Minute sauerstofffrei.

5.3.3 Belichtung

Um bei Belichtungsexperimenten trotz der hohen Dichte der Probe möglichst viele Zellen dem Licht auszusetzen, wird die Suspension mit einer hohen Durchflußrate begast. Durch eine starke Verwirbelung sollen in kurzer Zeit alle Zellen an der Lichtaustrittsfläche des Lichtleiters vorbeigetrieben werden, so daß sie wenigstens zeitweise belichtet sind. Wegen des notwendigen großen Gasdurchflusses muß mit gepulster Begasung gearbeitet werden, so daß die meisten Zellen während der Messung selbst etwa eine halbe Sekunde im Dunkeln sind.

Um eine Kohlenstoffquelle anzubieten, wurde bei Photosyntheseversuchen ein Gasmisch aus 96 % N_2 und 4 % CO_2 verwendet.

Die Güte der Belichtung kann bei diesem Aufbau nicht direkt bestimmt werden. Eine einfache Messung der Photosyntheserate durch Sauerstoffmessungen ist nicht möglich, da Photosynthese nur stattfindet, während die Probe von großen Gasmengen durchströmt wird, die den Sauerstoff aus der Probe wieder austreiben.

Es gibt jedoch zwei Tatsachen, die dafür sprechen, daß die gewählte Methode der Probenbelichtung tatsächlich Photosynthese ermöglicht:

1. anaerobe, das heißt mit Stickstoff begaste Proben, zeigen unterschiedliche Spektren bei Belichtung und im Dunkeln. Das kann nur ein Effekt des Lichtes sein (siehe die Diskussion der Spektren in Kap. 5.5.2).
2. Mit Stickstoff begaste, verwirbelte Suspensionen haben im Licht eine geringe, aber meßbare O_2 -Konzentration von 1,3 bis 1,7 mg l^{-1} . Der Sauerstoff muß durch Photosynthese entstanden sein.

Wenn die Rate abgeschätzt wird, mit der Sauerstoff durch die Stickstoffbegasung aus der Suspension ausgetrieben wird, kann die Photosyntheserate grob bestimmt werden. Im Anhang 2 ist die Bestimmung der Sauerstoffproduktionsrate dargestellt.

Für die erwähnte typische Probe mit 940 μl PCV und einer Respirationsrate von 2,1 mg $l^{-1} O_2 \text{ min}^{-1}$ im Dunkeln wurde eine Sauerstoff-Netto-Produktionsrate von etwa 1,3 mg $O_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ermittelt. Kirst (1980a) hat unter normalen Bedingungen an *Platymonas* beispielsweise eine Sauerstoffnettoproduktion gemessen, die zwischen dem 2- und 3-fachen des Verbrauchs durch Atmung lag.

Für die hier verwendete Probe mit einer Atmungsrate von 2,1 mg $O_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ wäre folglich eine Sauerstoffproduktion von 6 mg $O_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ normal. Davon wird etwa 1/5 erreicht.

Diese Syntheserate wird bei Zellen erzielt, die sich mindestens 0,3 s - das heißt während der Begasungspausen - im Dunkeln befinden. Die tatsächliche Syntheserate wird höher als die hier bestimmte sein, da ein Teil des erzeugten Sauerstoffs sofort wieder veratmet wird, denn auch bei schwachbelichteten Zellen ist die Atmung nicht niedriger als im

Dunkeln. Andererseits ist nicht ausgeschlossen, daß bei einem Teil der Algen, die dem Licht häufiger oder stärker ausgesetzt sind, die Atmung reduziert ist, so daß es nicht zulässig ist, die Atmungsrate der Suspension im Dunkeln zur gemessenen Sauerstoffproduktion zu addieren, um so die Brutto-Photosyntheserate zu erhalten.

Die bei den Experimenten verwendete Lichtintensität (am Ausgang des Lichtleiters) war kein begrenzender Faktor für die Photosynthese. Eine Reduzierung der Intensität durch Schließen einer Blende hatte keinen Einfluß auf die Syntheserate. Daraus ist zu schließen, daß die Algen - wenn sie sich im Licht befinden - gesättigt sind. Die einzelne Zelle sieht wahrscheinlich ein Lichtprofil wie in Abbildung 5-3 gezeigt.



Abbildung 5-3: Belichtungsprofil einer Zelle (schematisch)

I : Puls und Aquisition

II : Begasungsphase

Auch während der Verwirbelung der Probe befindet sich die einzelne Zelle zeitweilig im Schatten anderer.

Für die Bewertung von Spektren ist die Folgerung wichtig, daß unter den gewählten Meßbedingungen der anaerobe und der aerobe Zustand im Dunkeln eindeutig definiert und reproduzierbar ist. Die Bedingungen der Photosynthese sind weniger genau definiert. Die Synthese erreicht ihren Sättigungswert nicht. Ihr genauer Grad hängt von den jeweiligen Meßbedingungen wie Probendichte und Verwirbelungsrate ab.

5.4 pH-Messungen an *Platymonas*: Eichung

Zur Bestimmung cytoplasmatischer pH-Werte wurde eine Eichkurve aufgenommen in einer wässrigen Lösung von 140 mM KCl, 10 mM NaCl, 16 mM MgSO_4 , 15 mM CaCl_2 , 20 mM KH_2PO_4 und 7 mM Na-Polyphosphat mit einer mittleren Kettenlänge von 15 (Calgon). Jede polyP-Kette trägt im Mittel 17 Na^+ -Ionen, so daß die Konzentration von Na^+ durch Zugabe von Calgon um 119 mM erhöht wird. Insgesamt sind ca. 290 mM einwertiger und ca. 30 mM zweiwertiger Kationen in der Lösung. Diese Ionenzusammensetzung ähnelt den intrazellulären Konzentrationen ein- und zweiwertiger Kationen, wie sie von Kirst (1977c) sowie Dickson und Kirst (1986) bestimmt worden sind. Polyphosphat wurde hinzugefügt, um die Komplexbildung von Metallionen an Komplexbildnern zu berücksichtigen. Vor allem Mg^{2+} und Ca^{2+} sind zu einem großen Teil nicht frei im Cytoplasma, sondern an ATP, anorganische Polyphosphate - soweit vorhanden - und andere Polyanionen gebunden. Die Erniedrigung des pK_a ist deshalb geringer als durch zusammen 31 mM freier zweiwertiger Kationen bewirkt würde. Die hier eingesetzte Konzentration des Polyphosphats entspricht etwa intrazellulären Konzentrationen, wie sie aus typischen Spektren abgeschätzt worden sind.

Da Polyphosphat als Na-Salz zum Eichmedium gegeben wurde, liegt die Gesamtkonzentration von Na^+ im Medium mit 129 mM etwas über den von Kirst (1977c) sowie Dickson und Kirst (1986) bestimmten Werten. Stattdessen wurde die K^+ -Konzentration etwas reduziert. Der Austausch von K^+ gegen Na^+ dürfte einen vernachlässigbaren Fehler sowohl bezüglich pK_a als auch bezüglich δ_A und δ_B verursachen. Die Konzentration von Cl^- im Eichmedium übersteigt ebenfalls die im Cytoplasma gemessene - es ist aber nicht bekannt, welche Anionen die Ladung der im Cytoplasma festgestellten Kationen ausgleichen. Im Cytoplasma vorhandene geladene organische Verbindungen wurden außer Acht gelassen. Es ergibt sich eine Sigmoidkurve mit $\text{pK}_a = 6,75$, $\delta_A = 0,67$ ppm und $\delta_B = 3,20$ ppm.

Die resultierende Kalibrierung ist interessanterweise den Kurven für das Cytoplasma von Hefe (den Hollander et al. 1981) und für die Süßwasseralge *Chlorella fusca* (Sianoudis et al. 1987) sehr ähnlich. Die effektive Konzentration freier Kationen scheint in der marinen Alge *Platymonas*

subcordiformis nicht sehr von den Verhältnissen in Süßwasserorganismen abzuweichen.

Die chemischen Verschiebungen sind mit einer spektralen Auflösung von 0,03 ppm bestimmt worden, wenn das Signal eine scharfe Spitze aufweist. Für das P_i -Signal ist dies meist der Fall. Diese Auflösung erlaubt es, die pH-Werte auf $\pm 0,05$ im linearen Bereich der Kurve zwischen pH 6 und 7,6 abzulesen. Im etwas flacheren Bereich zwischen 7,6 und 8 sind die pH-Werte auf $\pm 0,07$ genau ablesbar.

Diese Genauigkeit bezieht sich auf pH-Differenzen. Der Fehler des absoluten Wertes hängt vor allem von der korrekten Nachbildung des pK_a im Eichmedium ab. Der größte Unsicherheitsfaktor ist die genaue Menge von Polyphosphat, die dem Eichmedium hinzugefügt wird. Wenn das gemessene polyP anders als hier angenommen dem cytoplasmatischen Mg^{2+} nicht frei zugänglich ist oder wenn polyP im Cytoplasma in geringerem Maße Mg^{2+} komplexiert als in vitro, wäre die Menge freier zweiwertiger Ionen im Cytoplasma höher als im Eichmedium modelliert. Der tatsächliche pK_a im Cytoplasma wäre niedriger und der aus der Eichkurve abgelesene pH-Wert läge zu hoch. Der Fehler wird bei 290 mM einwertiger und 30 mM zweiwertiger Kationen auf jeden Fall unter 0,4 pH-Einheiten liegen.

Die hier vorgenommene Eichung wird gestützt durch die Tatsache, daß die polyP-Signale im Eichmedium bei der gleichen Frequenz liegen wie in vivo - bei -22 ppm. Die chemische Verschiebung hängt im physiologischen Bereich von den Konzentrationen zweiwertiger Ionen ab (Kap. 6.). Eine größere Abweichung der Ionenzusammensetzung würde sich in einer abweichenden Lage des polyP-Signals bemerkbar machen.

Im Ergebnis sind die Bestimmungen von pH-Differenzen innerhalb einer Probe begrenzt durch die Auflösung der chemischen Verschiebung von P_i ($\pm 0,03$), entsprechend $\pm 0,05$ pH-Einheiten. Die Verschiebung der Eichkurve durch Fehlanpassung des Eichmediums wird auf maximal 0,2 pH-Einheiten abgeschätzt. Wie oben erläutert, dürfte die Fehlanpassung eher dazu führen, daß zu hohe als daß zu niedrige Werte abgelesen werden.

5.5. Typische Spektren unter Standardbedingungen

5.5.1. Die Zuordnung der Signale

Die Spektren von *Platymonas subcordiformis* enthalten Signale aller in Kapitel 4.3 genannten Verbindungen. Die Zuordnung der Signale zu den Verbindungen erfolgt anhand von Daten in der Literatur und durch Standardzugabe zu Extrakten. In Abbildung 5-4a ist ein typisches Spektrum einer belüfteten Suspension dargestellt. Abbildung 5-4b zeigt den Perchlorsäureextrakt gut belüfteter Zellen. Beim Vergleich beider Spektren ist zu beachten, daß der intrazelluläre pH bei etwa 7,5 liegt, während der PCA-Extrakt auf einen pH-Wert von 8 eingestellt ist.

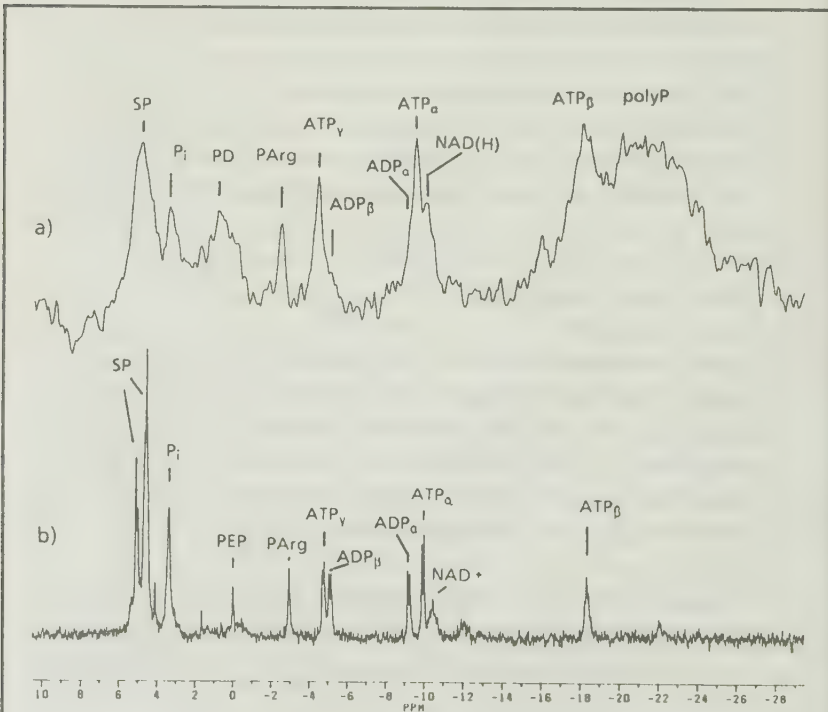


Abbildung 5-4: ^{31}P -Spektren von *Platymonas subcordiformis*

- a) Spektrum einer belüfteten Zellsuspension: 400 Scans in 10 min aufgenommen
- b) Perchlorsäureextrakt einer belüfteten Zellsuspension
Zellen (2 ml PCV) extrahiert in 2,5 ml kalter 70 %iger PCA; nach 5 min neutralisiert mit KH_2CO_3 ; Überstand lyophilisiert und in 2 ml D_2O gelöst, 36.000 Scans aufgenommen in 10 h bei pH 8

5.5.1.1 Anorganisches Phosphat

In den Zellen ist nur ein einziges Signal von P_i zu sehen. Im allgemeinen würde man vier P_i -Signale erwarten, die den verschiedenen Zellkompartimenten zuzuordnen wären (Vakuole, Cytoplasma, Mitochondrien, Chloroplasten). Das hier beobachtete P_i dürfte hauptsächlich den pH des Cytoplasmas anzeigen.

Vakuoläres Phosphat würde bei +1 ppm entsprechend einem pH unter 6 erwartet werden, wie er für Vakuolen bei *Chlorella* (Sianoudis et al. 1985), *Nitellopsis* (Mimura und Kirino 1984) und höheren Pflanzen typisch ist (Roberts et al. 1980, Martin et al. 1982, Wray et al. 1985). Abweichend von diesen Organismen lebt *Platymonas* in Salzwasser. Die Alge *Lamprothamnium*, die ebenfalls in Seewasser lebt, hat bei einem äußerem pH unter 8 einen vakuolären pH von 5, der auch bei externen pH von 9 unter 6 bleibt (Kirst und Bisson 1982). Ein für diesen pH typisches Signal gibt es im Spektrum von *Platymonas* nicht.

Mitochondrien kommen für ein sichtbares P_i -Signal nicht in Frage. Ihr Volumen in der Zelle ist so klein (ca. 3 % bei *Platymonas* (Kirst und Kramer 1982)), daß auch bei einer erhöhten P_i -Konzentration in ihnen der Anteil von mitochondrialem P_i am totalen intrazellulären P_i klein wäre. Daneben kann die verringerte Beweglichkeit des P_i wegen der höheren Dichte der mitochondrialen Matrix und der Bindung des P_i an Enzyme zur Reduzierung des Signals beitragen.

Der Chloroplast macht etwa 50 % des Zellvolumens aus (ohne Pyrenoid). Vergleichbar in dieser Beziehung ist *Chlorella fusca*, deren Chloroplast ca. 30 % des Zellvolumens einnimmt. In *Chlorella* ist gezeigt worden, daß das dort sichtbare nichtvakuoläre P_i -Signal den pH des Cytoplasma anzeigt, indem Variationen der chemischen Verschiebung von P_i mit denen von deoxy-Glukose-6-Phosphat (dG6P) verglichen wurden. Es ist bekannt, daß dG6P im Cytoplasma verbleibt (Sianoudis et al. 1985, 1987).

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß weitere P_i -Signale im Spektrum vorhanden sind, die vom cytoplasmatischen P_i -Signal verdeckt werden. Während der Atmung ist zum Beispiel ein pH-Gefälle von etwa 1 über die innere Membran der Mitochondrien zu erwarten. Dieses Gefälle würde in einem Abstand zwischen cytoplasmatischem und mito-

chondrialem P_i von etwa 0,4 ppm resultieren. Diese Differenz würde nur Signale gleicher Größe als getrennt erscheinen lassen.

Dasselbe gilt für P_i im Stroma photosynthetisierender Chloroplasten. In den unter Belichtung aufgenommenen Zellen ist ein zweites P_i -Signal nicht erkennbar. Das Zusammenfallen zweier Signale aus verschiedenen Kompartimenten wegen schnellen Austausches über die Membran kann als ausgeschlossen gelten. Der Phosphattransport in den Chloroplasten kann durchaus schnell sein; er ist aber gekoppelt an den Austausch gegen Triosephosphate. Ein schneller P_i -Export aus dem Chloroplasten ist nicht bekannt.

Die von Sianoudis et al. (1987) diskutierten Argumente für das Fehlen eines stromatären P_i -Signales in *Chlorella fusca* sind auch auf *Platymonas* übertragbar. Der P_i -Gehalt von Chloroplasten nimmt bei Belichtung deutlich ab (z.B. von 12 auf 3 - 4 mM, gemessen an isolierten Spinat-Chloroplasten (Lilley et al. 1977)). Außerdem wird das P_i teilweise enzymgebunden und damit für die NMR-Spektroskopie unsichtbar sein.

Möglich ist allerdings, daß die P_i -Signale zweier Kompartimente nicht unterscheidbar sind, weil entweder die pH-Differenz zu klein ist oder weil unterschiedliche Ionenkonzentrationen pH-induzierten Verschiebungsdifferenzen entgegenwirken. Ein stromatärer pH von 8 läge nahe bei gemessenen cytoplasmatischen pH-Werten in "energiereichen" Zellen (Kap. 5.2.2). Der postulierte saure pH von 5 in den Thylakoiden würde jedoch ein deutlich getrenntes P_i -Signal um 1 ppm hervorrufen, wenn sie eine ausreichende Menge Phosphat enthielten.

5.5.1.2 Phosphomonoester

Das Phosphomonoester-Signal ist etwa 1 ppm breit. Im allgemeinen hat es eine verbreiterte Spitze und ausgeprägte Schultern; es enthält überlagerte Signale verschiedener Verbindungen.

Im Perchlorsäureextrakt ist das Signal in sieben Linien aufgelöst (Abb. 5-5a). Die Zuordnung der Linien zu einzelnen Metaboliten allein anhand der chemischen Verschiebung ist nicht eindeutig möglich, da die Signale verschiedener Monoester recht dicht beieinanderliegen. Die Standardzugabe und erneute Aufnahme des Extraktspektrums ist zur Bestimmung

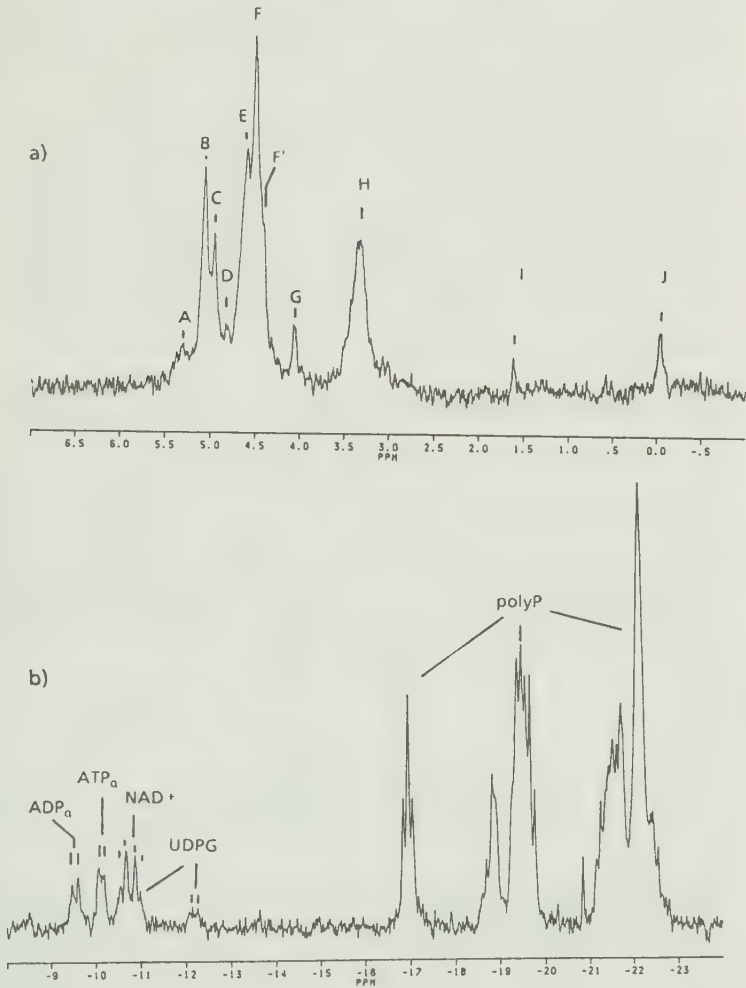


Abbildung 5-5: ^{31}P -Spektren von Perchlorsäureextrakten

- a) Hochfrequente Seite des Extraktes Abbildung 5-4b
Zuordnung der Signale siehe Tabelle 5-2
- b) Niederfrequente Seite eines Extraktes (vorübergehende
Alkalisierung führte zur Lösung von polyP - siehe Kap. 6;
36.000 Scans aufgenommen in 10 h bei pH 7,0)

notwendig. Aber auch unter Hochauflösungsbedingungen kann die Überlagerung verschiedener Signale nicht ausgeschlossen werden. Die Untersuchung eines Extraktes bei verschiedenen pH-Werten kann die Sicherheit der Bestimmung erhöhen, da die Monoester mit etwas voneinander abweichenden pK_a -Werten titrieren. Wegen der notwendigen langen Meßzeiten bei PCA-Extrakten (i.a. mehr als 10 000 Scans), und da die Zuckerphosphate im Extrakt zu P_i hydrolysieren, wurde jede Bestimmung nur bei einem pH-Wert vorgenommen.

In Tabelle 5-2 ist eine Zuordnung der Linien des Extraktes von Abbildung 5-5a zum Metaboliten angegeben. Mannose-6-Phosphat, Fruktose-6-Phosphat und Fruktose-1,6-bis-Phosphat sind dem Extrakt zugefügt worden. Für die anderen Monoester sind anhand der Daten aus Tabelle 4-4 mögliche Zuordnungen angegeben.

Tabelle 5-2: Zuordnung der Signale im Extrakt		
Signal ¹⁾	δ	Metabolit
A	5,14	DHAP (?) + G6P (?)
B	4,94	GA3P
C	4,80	Ma6P (+ F1P)
D	4,68	3PG
E	4,48	$\left. \begin{array}{l} \text{F6P} \\ \text{FbP} \\ \text{FbP} \end{array} \right\} + \text{DHAP}$
F	4,36	
F*	4,30	
G	3,90	AMP (?)
H	3,16	2 PG (?)
I	1,44	P_i
J	- 0,1	Diester ? PEP
1) Bezeichnung wie in Abb. 5-5		

Die größten Signale - B, C, E und F - dürften vor allem zum Zuckerphosphat-Signal in vivo beitragen. Die chemische Verschiebung von B ist typisch für Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Dieses Signal hydrolysiert im Extrakt schneller als die anderen Signale.

Signal C wächst sowohl bei Addition von Mannose-6-Phosphat als auch bei Zugabe von Fruktose-1-Phosphat zum Extrakt.

Signal E und F entsprechen den beiden Signalen des β -Anomers von Fruktose-1,6-Phosphat. Signal F wächst außerdem bei Zugabe von Fruktose-6-Phosphat, das ebenfalls zu den Vorprodukten von Mannit gehört. Die Schulter von F liegt an einer Stelle, an der das Signal von Adenosinmonophosphat wie auch der Ribosemonophosphatgruppe von NADP^+ auftritt.

Die Zuordnung der kleineren Signale A, D und G ist unsicherer. A könnte von Dihydroxiacetonphosphat wie auch von Glukose-6-Phosphat herühren. D ist möglicherweise 3-Phosphoglycerat und G - das wie B verhältnismäßig rasch hydrolysiert - könnte 2-Phosphoglycerat sein. Weitere Phosphorester, zum Beispiel als Zwischenprodukte des oxidativen Pentosephosphatzylus auftretende Pentosephosphate sind möglicherweise wegen geringer Konzentration unter den Signalen E und F verborgen.

H ist eindeutig das Signal von anorganischem Phosphat. Infolge der Hydrolyse der Phosphatmetaboliten wächst dieses Signal im Extrakt stetig an. Aldohexose-1-Phosphate wie G1P und Ma1P sind im Extrakt nicht nachweisbar. Das von Richter und Kirst (1987) in *Platymonas* festgestellte Mannitol-1-Phosphat würde ein Signal etwa bei +5,4 ppm erzeugen. In Extrakten ist keine Resonanz an dieser Stelle feststellbar, die Konzentration muß im Vergleich zu den anderen festgestellten Metaboliten gering sein. Dies stimmt mit der von Richter und Kirst ermittelten hohen Aktivität von Mannitol-1-Phosphatase überein, die Mt1P zu Mannitol umsetzt.

Im Ergebnis zeigt sich, daß das Signal um 4 ppm tatsächlich im wesentlichen von Zuckerphosphaten verursacht wird; die allgemein übliche Benennung mit SP (= sugar phosphates) ist gerechtfertigt.

Die Monoester GA3P und DHAP sind Triosephosphate, die zwischen Chloroplasten und Cytoplasma hin- und hertransportiert werden können. Sie spielen eine zentrale Rolle sowohl bei der Glykolyse als auch in den Pentosephosphatzyklen. Dasselbe gilt für 3PG.

Die Furanosephosphate F1,6bP und F6P sind gleichfalls zentral beim Ab- und Aufbau von Stärke. Außerdem stellen sie Vorstufen der Mannitolsynthese dar.

In vivo lassen sich anhand der Spektren nur globale Aussagen über Zuckerphosphate machen. Ausnahmen bilden zum Beispiel Suspensionen von Hefezellen (Navon et al. 1979), bei denen das Zuckerphosphatsignal hinreichend scharf und strukturiert ist, um einzelne Metaboliten zu identifizieren. Bei Algen ist die Gewinnung eines Zellextraktes notwendig. Die Zuordnung der einzelnen Resonanzen sollte durch zusätzliche enzymatische Analysen oder ^{13}C -NMR gestützt werden (den Hollander et al. 1986).

5.5.1.3 Signale in der Diester-Region

Das Signal um 0 ppm ist auf Phosphodiester zurückzuführen. Phospholipide sind wegen ihres festen Einbaus in die Zellmembran immobilisiert, so daß sie im allgemeinen unsichtbar sind. Nichtaggregierte Vorstufen wie Glycerophosphorylcholin und ähnliche sind wesentlich mobiler, so daß sie ein - wenn auch breites - Signal hervorrufen. Bei Spektren gut belüfteter Zellen ist auf dem breiten Untergrund ein schärferes Signal erkennbar. Es nimmt zu, wenn die Zellen Bedingungen ausgesetzt sind, in denen das Cytoplasma stärker alkalisiert wird als im Normalzustand (siehe Kap. 5.6.). Im Zellextrakt liegt bei 0,3 ppm ein scharfes Signal (Signal J in Abb. 5-5a), das durch Standardaddition als Phosphoenolpyruvat identifiziert wurde.

Das Signal I im Extrakt bei 1,44 ppm ist nicht identifiziert worden. Es verschiebt sich nicht mit dem pH, wie der Vergleich von Extrakten bei verschiedenen pH zeigt. Bárány und Glonek (1984) haben in diesem Bereich Diester festgestellt.

Weitere Diester sind in PCA-Extrakten meist nicht enthalten. Bei alkalischer Extraktion des Pellet werden offenbar Diester der Phospholipide mobilisiert, so daß sie weitere Signale in der Gegend von 0 ppm erzeugen.

5.5.1.4 Phosphagene und Nukleotide

Bei gut belüfteten Spektren tritt ein zusätzliches Signal bei 3,0 ppm auf. Im Extrakt wurde die Linie Phosphoarginin zugeordnet.

Ein Phosphagensignal wurde in pflanzlichen Organismen bisher nicht nachgewiesen. In tierischem Muskelgewebe ist Phosphokreatin ein Speicher phosphatgebundener Energie. In Wirbellosen dient PArg als Phosphagen und ist auch in NMR-Spektren beobachtet worden zum Beispiel an *Tapes watlingi* (Barrow et al. 1980), an *Haliotis cracherodii* (Burt et al. 1976), an *Palaemon elegans* (Thébault et al. 1987) sowie am Ciliaten *Tetrahymena pyriformis* (Findly et al. 1983).

Charakteristisch für *Platymonas* ist ein kräftiger Rhizoid, der die Flagellen bewegt. Er funktioniert ähnlich wie tierische Muskelfasern. Die Kontraktion wird durch Ca^{2+} -Ionen getriggert, die nachfolgende Elongation scheint die Hydrolyse von ATP zu erfordern (Salisbury und Floyd 1978). Möglicherweise dient PArg als schnell verfügbare Reserve phosphatgebundener Energie, um während der Tätigkeit des Rhizoids eine konstante Konzentration von ATP und so ein ausreichendes Phosphorylierungspotential aufrecht zu erhalten, entsprechend der Rolle von Phosphokreatin in Muskelgeweben.

Die Signale bei -4,9 ppm, -10,0 ppm und -18,7 ppm im Spektrum intakter Zellen lassen sich anhand der Extrakte leicht als ADP und ATP identifizieren. Im Extraktspektrum (Abb. 5-5b) erzeugt ADP zwei Dubletts bei -5,03 ppm/-5,18 ppm (terminale Gruppe / β -Phosphat) und bei -9,15 ppm/-9,30 ppm (veresterte Gruppe / α -Phosphat). ATP erzeugt zwei Dubletts bei -4,65 ppm/-4,80 ppm (terminale Gruppe / γ -Phosphat) und bei -4,9 ppm/-10,05 ppm (veresterte Gruppe / α -Phosphat) sowie ein Triplett des - mittleren - β -Phosphats bei -18,3/18,4/18,5 ppm. In intakten Zellen sind die Signale so breit, daß ATP und ADP nicht voneinander unterscheidbar sind. Die Anwesenheit von ADP auch in Zellen mit hohem ATP-Spiegel kann aus Schultern des ATP-Signals geschlossen werden. Die Anwesenheit von ATP kann dagegen direkt am β -Signal des ATP abgelesen werden.

Die Lage der Nukleotidsignale hängt vom Grad der Komplexierung mit zweiwertigen Kationen ab. Insbesondere das β -Signal vom ATP zeigt, daß ATP in vivo mit Mg^{2+} komplexiert ist. Auch in den Extrakten ist Mg^{2+} nicht vollständig durch EDTA-Zugabe eliminiert. Die geringe Breite der Linien im Extrakt zeigt, daß andere Nukleotide neben Adenosinphosphaten nur in geringen Mengen vorhanden sind. Pyrimidinnukleotide (Uridin- und Cytidin-Phosphate) würden Signale erzeugen, die etwas zu tieferen

Frequenzen verschoben wären (Ugurbil et al. 1978). GTP ist bei der erzielten Auflösung nicht vom ATP-Signal zu trennen.

Die breite Schulter bei -10,7 ppm erweist sich im gut aufgelösten Extrakt (Abb. 5-5b) als ein AB-Kopplungsmuster von NAD^+ und NADP^+ (Die reduzierten Formen NADH und NADPH sind im Sauern labil, so daß sie im Perchlorsäureextrakt nicht vorhanden sind (Blumenstein und Raftery 1972); sie würden zusätzliche Linien erzeugen, die neben den vier Linien der oxidierten Form nicht auflösbar sind).

Im Extrakt hebt sich ein kleines Signal bei -12 ppm vom Rauschen ab, das anhand seiner Lage und seiner Struktur (wahrscheinlich ein Dublett) als Signal eines Phosphats der Uridindiphosphatglukose gedeutet werden kann. Unter speziellen Bedingungen tritt UDPG (allgemein: Nukleosiddiphosphatglukose bzw. Nukleosiddiphosphathexose) bei Algen auch in höheren Konzentrationen auf (Sianoudis et al. 1985). Das andere Phosphat liegt unter den Dinukleotiddiphosphat-Signalen.

5.5.1.5 Anorganisches Polyphosphat

Das breite Signal bei -22 ppm mit einer Breite in halber Höhe von 5 ppm stammt von den nichtterminalen Gruppen längerkettiger Polyphosphate. Die Position des Signals stimmt überein mit der erwarteten Komplexbildung von Mg^{2+} und Ca^{2+} , deren Konzentration in der Zelle bekannt ist (Dickson und Kirst 1986). Die Mittelgruppen (PP-4) des langkettigen Phosphates (Kettenlänge > 7) liegen im nachgebildeten cytoplasmatischen Milieu (Kap. 5.4) bei -22,0 ppm. Präterminale Phosphate liegen bei -21,1 ppm (PP-3) und -19,1 ppm (PP-2). Dies liegt noch innerhalb des breiten Mittelgruppen-Signals, so daß getrennte Signale der präterminalen Phosphatgruppen in intakten Zellen nicht unterschieden werden können.

Die große Signalbreite des polyP ist typisch für die Anwesenheit paramagnetischer Ionen wie Mn^{2+} und Fe^{2+} , die auch im Kulturmedium vorhanden sind. Sie sind an die polyP-Ketten gemeinsam mit Mg^{2+} und Ca^{2+} komplexiert. Ein weiterer Beitrag zur Linienbreite kann in einer verringerten Beweglichkeit der Ketten liegen, wodurch τ_c verlängert und dadurch T_2 verkürzt wird.

Die Tatsache, daß die terminalen Phosphate (PP-1) des anorganischen polyP in vivo kein erkennbares Signal bei etwa -5 ppm erzeugen und daß die präterminalen Phosphate nur schwach sind - zu schließen aus der symmetrischen Form des Mittelgruppensignals - kann dahingehend interpretiert werden, daß die Ketten entweder sehr lang sind oder daß die Terminale durch Bindung an Proteine oder Zellwände immobil sind.

Kettenlängen von über 40 Gruppen sind von verschiedenen Algen bekannt (Glonek et al. 1971, Miyachi et al. 1964). EDTA-Extraktionen an *Platymonas* lassen ebenfalls auf größere Kettenlängen schließen. Das schließt die Immobilisierung der Terminale jedoch nicht aus. Im PCA-Extrakt sind Polyphosphate im allgemeinen nicht oder nur in Spuren vorhanden. Im alkalischen Milieu können sie aus dem Pellet PCA-behandelter Zellen mobilisiert werden. Das Resonanzmuster gelöster Polyphosphate hängt dann sehr stark vom pH-Wert und der Konzentration zweiwertiger Ionen ab (Kap. 6.).

Die longitudinalen Relaxationszeiten sind in vivo nur grob durch ein Inversions-Erholungs-Experiment bestimmt worden, ohne daß Beiträge des chemischen Austauschs zur gemessenen T_1 -Zeit berücksichtigt wurden. Es ergaben sich relativ lange Relaxationszeiten von 0,8 s für anorganisches Phosphat, Zuckerphosphate und Phosphoenolpyruvat. Die Nukleotide relaxierten schneller mit 0,3 s, das Dinukleotid NAD etwas langsamer mit 0,5 s (β -ATP wurde nicht gemessen).

Das breite Phosphodiestersignal relaxierte mit etwa 0,1 s, was auf eine geringere Beweglichkeit der Diester hinweist (als Phospholipide). Das polyP hat eine extrem kurze T_1 -Zeit von unter 0,01 s. Dies dürfte - wie auch die extreme Linienbreite - vor allem auf die Komplexbildung paramagnetischer Ionen wie Mn^{2+} zurückzuführen sein.

Aufgrund dieser Relaxationszeiten sind die Signale von lipidgebundenen Diester und Polyphosphat voll ausrelaxiert. Ihre Intensität ist deshalb proportional zu ihrer Konzentration in der Probe, während die Intensitäten der anderen Metaboliten (und des Standards!) korrigiert werden müssen (Korrekturfaktoren siehe Tab. 4-2 bzw. Gl. 4.57).

5.5.2. Zellen in unterschiedlichen Energiezuständen

5.5.2.1 Charakteristika der Spektren

Die in vivo-Spektren lassen sich grundsätzlich in zwei Kategorien einteilen, die unterschiedliche physiologische Zustände kennzeichnen.

Die Spektren des im folgenden als "energiearm" bezeichneten Zustandes werden typischerweise an anaeroben Suspensionen oder an Suspensionen unter extremen Streßbedingungen aufgenommen. Sie zeichnen sich aus durch einen sauren cytoplasmatischen pH und ein sehr kleines ATP-Signal (erkennbar vor allem an der geringen Größe oder der vollständigen Abwesenheit des β -Signals von ATP; Abb. 5-6a).

Spektren des als "energiereich" bezeichneten Zustandes werden an belüfteten (Abb. 5-6b, 5-6d) und an gut belichteten Suspensionen (Abb. 5-6c) gemessen. Das P_i -Signal weist auf ein alkalisches Cytoplasma hin, und ein deutlich erhöhtes ATP-Signal ist zu sehen. In gut belüfteten Zellen ist darüberhinaus ein Phosphoarginin-Signal vorhanden.

Das in Abbildung 5-6a gezeigte Spektrum wurde bei einem externen pH von 8 und Begasung mit N_2 im Dunkeln aufgenommen. Das Zuckerphosphat-Signal liegt bei +4,0 ppm, P_i bei +2,45 ppm entsprechend pH 7,1 $\pm$ 0,05, NAD^+ und andere Nikotin-Adenin-Dinukleotide liegen bei -10,7 ppm. Das β -Signal von ADP bei -5,7 ppm und das γ -Signal von ATP bei -5,1 ppm sind etwa gleich groß. Die Resonanz bei -10,0 ppm beinhaltet die α -Signale von ATP und ADP gleichermaßen. Das β -Signal von ATP tritt bei -19,0 ppm nur schwach hervor.

Dieselbe Suspension mit Sauerstoff begast, gleichfalls im Dunkeln, zeigt Abbildung 5-6b. Die Zuckerphosphate liegen bei +4,3 ppm. Das P_i -Signal hat an Intensität verloren und liegt bei +2,75 ppm entsprechend pH_{cyt} 7,40 $\pm$ 0,05. Bei -3,0 ppm ist ein zusätzliches Signal von PArg zu sehen; ATP tritt deutlich hervor bei -5,1 ppm, -10,1 ppm und -19,1 ppm. ADP ist von den breiten ATP-Signalen nicht eindeutig zu trennen. Die Schulter bei -5,6 ppm könnte vom ADP- β -Signal stammen. Pyridin-Adenin-Dinukleotide sind als breite Schulter bei -10,7 ppm sichtbar. Das Polyphosphat-Signal bleibt unverändert.

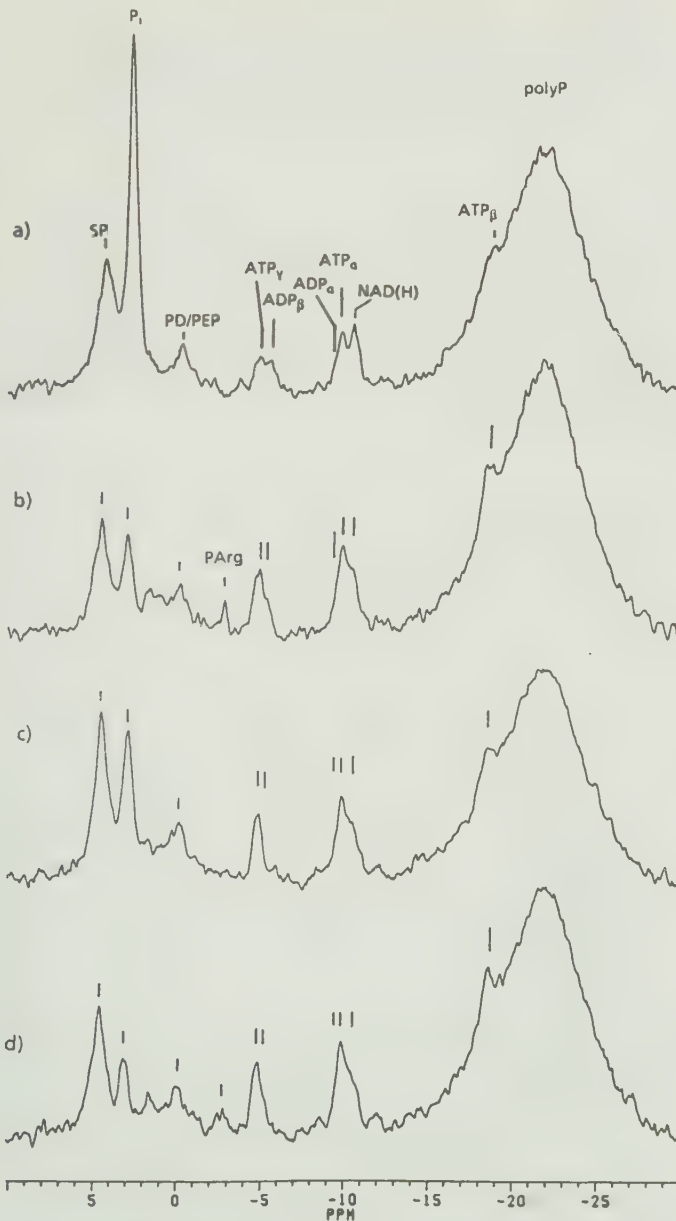


Abbildung 5-6: ^{31}P -Spektren von *Platyomonas* bei verschiedenen Versorgungszuständen

a) dunkel, begast mit N_2} b) dunkel, begast mit O_2} c) belichtet, begast mit N_2/CO_2}
d) belichtet, begast mit O_2/CO_2} - je 608 Scans, aufgenommen in 20 min.

Eine Begasung der anaeroben Suspension im Dunkeln mit einem Gemisch von 96 % N_2 und 4 % CO_2 statt mit reinem N_2 verursacht keine Änderung des Spektrums. Wenn diese Suspension aber mit weißem Licht belichtet wird, erhält man ein Spektrum ähnlich dem belüfteter Zellen (Abb. 5-6c).

Eine Konturkarte von Spektren, die unter Belichtung aufgenommen wurden, zeigt deutlich die Abhängigkeit der Spektren vom Licht (Abb. 5-7). Der intrazelluläre pH ist während der Belichtung zum alkalischen verschoben, und die Höhe des P_i -Signals ist deutlich verringert. Der ATP-Spiegel ist erhöht - in der Konturkarte ist das am γ -Signal bei -5 ppm zu erkennen. Bei -0,4 ppm ist ein erhöhtes Signal von PEP zu sehen. PARG ist hier nicht beobachtbar.

Abbildung 5-6d zeigt dieselbe Suspension belüftet bei gleichzeitiger Belichtung. Verglichen mit den im Dunkeln belüfteten Zellen ist das P_i -Signal noch kleiner; es liegt bei 2,95 ppm entsprechend $pH_{cyt} 7,85 \pm 0,07$.

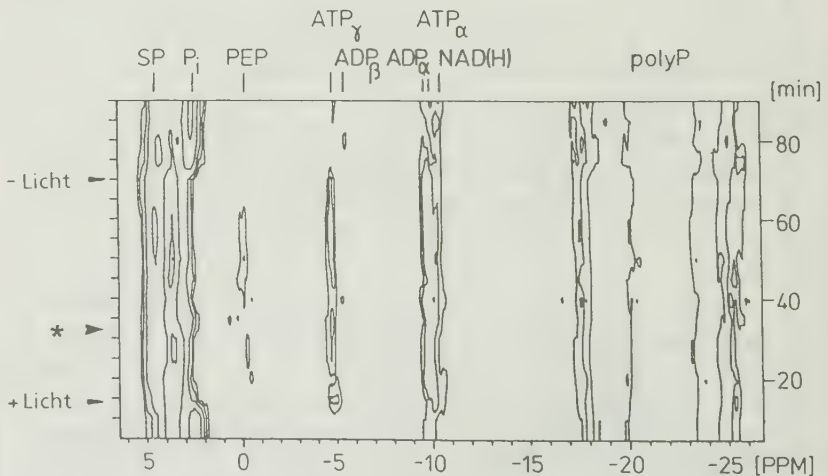


Abbildung 5-7: Konturkarte photosynthetisierender Zellen

Spektren von *Platymonas*, aufgenommen bei Belichtung und im Dunkeln, jeweils begast mit N_2/CO_2 ; bei * kurzfristige Unterbrechung der Belichtung. Die Konturkarte wurde mit der Standardprogrammausstattung erstellt (Leibfritz et al. 1985).

Abbildung 5-8a-d zeigt zum Vergleich Spektren einer Suspension von Zellen mit geringerem polyP-Gehalt, die unter gleichen Bedingungen wie die Spektren in Abbildung 5-6a-d aufgenommen worden sind. Der intrazelluläre pH liegt bei anaeroben Zellen bei $7,05 \pm 0,05$ ($\delta(P_i) = 2,30$ ppm; Abb. 5-8a) und bei belüfteten Zellen bei $7,85 \pm 0,07$ ($\delta(P_i) = 2,95$ ppm; Abb. 5-8b). Abgesehen von der etwas größeren pH-Differenz zwischen atmenden und glykolsysierenden Zellen sind die übrigen Charakteristika der Spektren dieselben wie in Abbildung 5-6. Der pH-Wert der belichteten Zellen liegt mit $7,20 \pm 0,05$ ($\delta(P_i) = 2,47$ ppm) zwischen den beiden eben genannten Werten (Abb. 5-8c); bei gleichzeitiger Belichtung und Belüftung steigt der pH nicht über 7,85, dem Wert, der auch in atmenden Zellen ohne Belichtung erreicht wird (Abb. 5-8d). - Die beiden Suspensionen lassen erkennen, mit welchen biologisch bedingten Variationen zwischen unterschiedlichen Proben zu rechnen ist.

Spektren von Zellen, die auf Glykolyse als einzige Energiequelle angewiesen sind, zeigen den typischen energiearmen Zustand, atmende Zellen zeigen den typischen energiereichen Zustand. Die Ähnlichkeit der Spektren belichteter anaerober Zellen mit denen atmender Zellen zeigt, daß - ungeachtet der Schwierigkeit einer quantitativen Bestimmung der Photosyntheserate im Einzelfall - die Zellen auf die Belichtung reagieren. Der Anstieg des ATP-Spiegels ist deutlich, so daß von energiereichen Zellen gesprochen werden kann. Am Spektrum ist aber nicht entscheidbar, ob der beobachtete ATP-Anstieg direkt auf die Photosynthese zurückzuführen ist oder ob der von den Zellen gebildete Sauerstoff von den Zellen, die sich durch gegenseitige Abschattung ja teilweise im Dunkeln befinden (Kap. 5.2.), gleich wieder veratmet wird, so daß das Spektrum im Ergebnis dem einer Suspension atmender Zellen entspricht.

Das Fehlen des PArg-Signals in stickstoffbegasten belichteten Zellen kann ein Effekt von Stoffwechselunterschieden zwischen Respiration und Photosynthese sein. Wahrscheinlicher ist, daß die Energieversorgung dieser Zellen aufgrund der experimentellen Bedingungen im allgemeinen schlechter ist als bei belüfteten Zellen. Dafür spricht, daß der pH und der ATP-Spiegel in belichteten Zellen meist nicht ganz so weit ansteigt wie bei belüfteten Suspensionen. Vermutlich werden nur bei einem ausreichend hohen ATP-Spiegel Phosphoryle auf Arginin übertragen. Das PArg-Signal bei Zellen, die gleichzeitig belichtet und belüftet werden, zeigt, daß die Phosphorylierung von Arginin im Licht nicht unterbunden

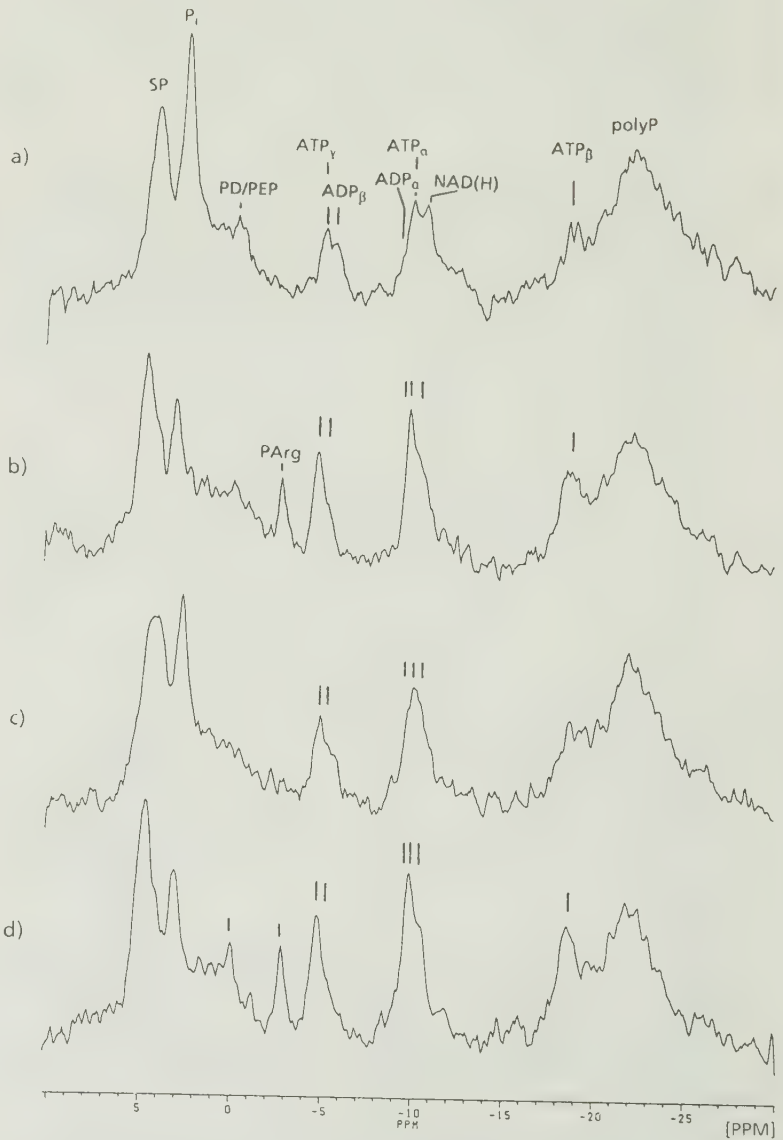


Abbildung 5-8: ^{31}P -Spektren von *Platymonas* bei verschiedenen Versorgungszuständen

a) dunkel, begast mit N_2/CO_2 b) dunkel, begast mit Luft
c) belichtet, begast mit N_2/CO_2 d) belichtet, begast mit Luft
400 Scans, aufgenommen in 10 min.

wird. In diesen Zellen ist das P_i -Signal tendenziell noch etwas kleiner als bei im Dunkeln belüfteten Zellen. Das kann auf eine zusätzliche ATP-Produktion in den Chloroplasten zurückzuführen sein. Eine einfache Beeinflussung des Metabolismus durch eine Erhöhung der Temperatur in der Probe - hervorgerufen durch die Absorption des in die Suspension geleiteten Lichtes - kann aber nicht ausgeschlossen werden.

5.5.2.2 Metabolitenkonzentrationen

Die intrazellulären Konzentrationen von phosphorylierten Verbindungen können aus den Spektren abgeschätzt werden, wenn die Fläche der einzelnen Signale ermittelt wird und das intrazelluläre Volumen bekannt ist. Gegebenenfalls müssen - wie in Kap. 4.2.1 dargestellt - Korrekturfaktoren zum Ausgleich unterschiedlicher Relaxationszeiten berücksichtigt werden.

In anaeroben Zellen wurde die Konzentration von Phosphatgruppen gegen einen geeichten Standard gemessen. Es zeigt sich, daß die Konzentration von mobilem intrazellulärem Phosphat nur wenig vom Phosphatangebot im Medium abhängt, wenn das langkettige Polyphosphat gesondert betrachtet wird.

In Abbildung 5-9 ist die Konzentration von polyP (C_{polyP}) und die von Phosphat ohne polyP (C_{P_i}) für Zellen nach unterschiedlichen Zeiten in phosphatfreien und in phosphathaltigen Medien dargestellt. Die Spektren einiger dieser Suspensionen zeigt Abbildung 5-10. Bezogen auf das gesamte intrazelluläre Volumen (entsprechend 80 % des PCV (Dickson und Kirst 1986)) liegt C_{P_i} zwischen 39 und 26 mmol l^{-1} ($\pm$ etwa 10 %). Goldfarb et al. (1984a) haben ähnliche Ergebnisse bei *Acetabularia* erhalten; Konzentrationen von ATP, ADP und P_i waren für $[P_i]_{\text{ext}} < 0,03 \text{ mmol l}^{-1}$ von der Phosphatkonzentration im Medium unabhängig.

Die Konzentration von polyP-gebundenem Phosphat hängt dagegen sehr stark von den Anzuchtbedingungen ab. Phosphatmangel verursacht eine Abnahme des polyP-Signals (erkennbar an Meßergebnissen an Proben, die aus demselben Ansatz stammen - in Abb. 5-9 gekennzeichnet). Das Verhältnis von sichtbarem polyP zu dem übrigen Phosphat lag bei den meisten Suspensionen zwischen 1 und 5. In Abbildung 5-9 variiert dieses Verhältnis zwischen 1 und 3,5, entsprechend 23 bis 130 mmol l^{-1} polyP-

gebundenem Phosphat. Die totalen Phosphatkonzentrationen liegen zwischen 50 und 170 mmol l^{-1} .

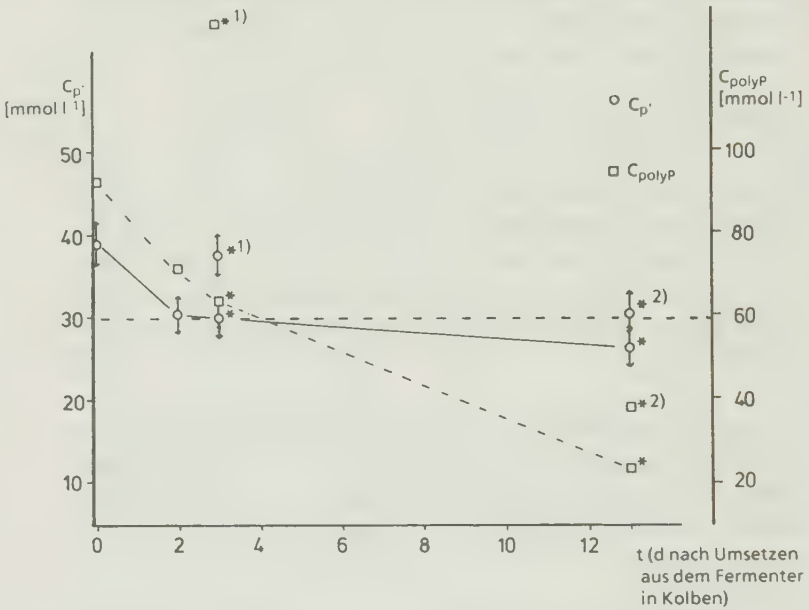


Abbildung 5-9: Intrazelluläres Phosphat bei Kultivierung in verschiedenen Medien

Das Medium im Kolben enthielt kein P_i , außer: 1) Medium im Kolben enthielt 0,3 $\text{mmol l}^{-1} P_i$, 2) Medium im Kolben enthielt 0,3 $\text{mmol l}^{-1} P_i$ nach dem 10. Tag.

*) Proben aus identischem Ansatz

Die Konzentration ist auf das Zellvolumen bezogen

Die hier genannten Konzentrationen stimmen auf den ersten Blick mit den von Kirst (1977c) colorimetrisch nach Deuticke ermittelten Werten überein, wobei die dort untersuchten *Platymonas* jedoch in Medien mit sehr viel höheren P_i -Konzentrationen von 3,5 mmol l^{-1} (und 0,2 bzw. 0,5 $\text{mol l}^{-1} \text{NaCl}$) kultiviert wurden. Kirst ermittelte außer der totalen Phosphorkonzentration von $117 \pm 31 \text{ mmol l}^{-1}$ beziehungsweise $93 \pm 23 \text{ mmol l}^{-1}$ Phosphatkonzentrationen in einer TCA (= Trichloressigsäure)-Fraktion von $60 \pm 18 \text{ mmol l}^{-1}$ und im HCl-Hydrolysat des Pellets der TCA-Fraktion von $50 \pm 10 \text{ mmol l}^{-1}$. Die angegebene Zuordnung (Kuhl 1974) der TCA-Fraktion zum Orthophosphat sowie den säurelöslichen

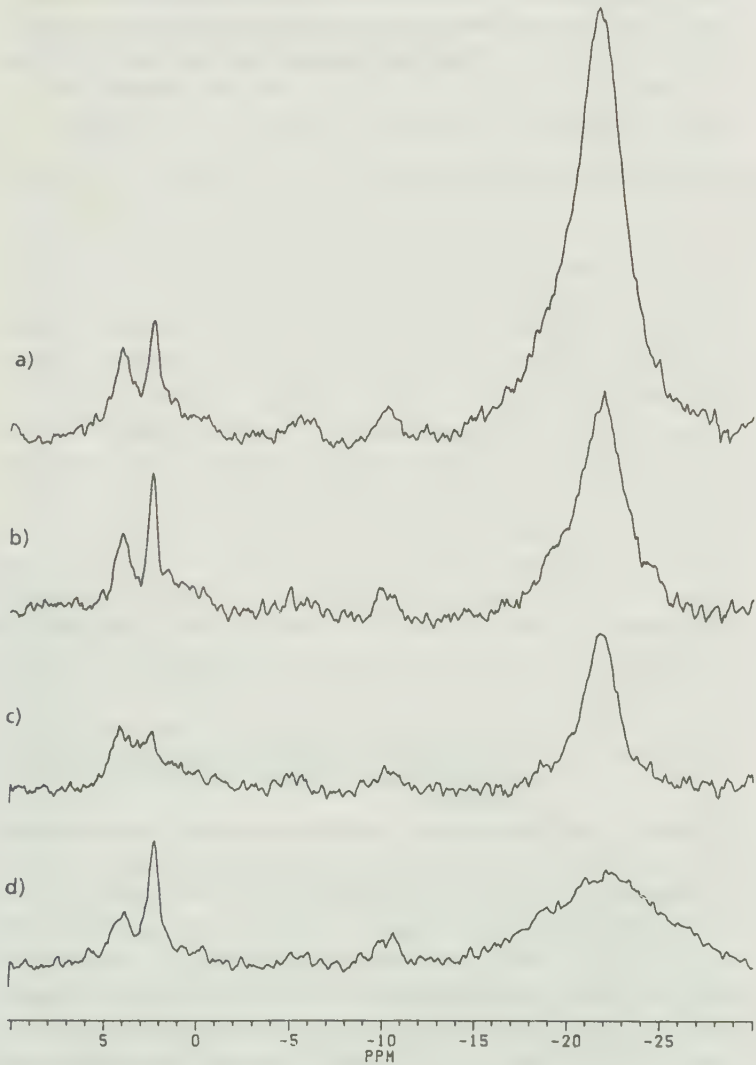


Abbildung 5-10: Spektren von Zellen, die bei unterschiedlichen Phosphatversorgungen gewachsen sind

a) 3 d im Kolben mit $0,03 \text{ mmol l}^{-1} \text{ P}_i$ b) 3 d im Kolben ohne P_i

c) 13 d im Kolben ohne P_i d) 2 d im Kolben ohne P_i

Spektren a, b und c entstammen demselben Ansatz

Anteilen organischer Phosphate und des HCl-Hydrolysats zu Polyphosphaten ist jedoch nicht gesichert. Das Spektrum eines TCA-Extraktes von *Platymonas* (Abb. 5-11) zeigt einen großen Anteil von Polyphosphat (etwa 26 % des gesamten Phosphats im Spektrum) auch in dieser Fraktion. Die im Vergleich mit den NMR-Messungen höheren Konzentrationen von Orthophosphat, die Kirst angibt, sind daher wahrscheinlich vor allem durch Beimengungen von polyP in der TCA-Fraktion zu erklären.

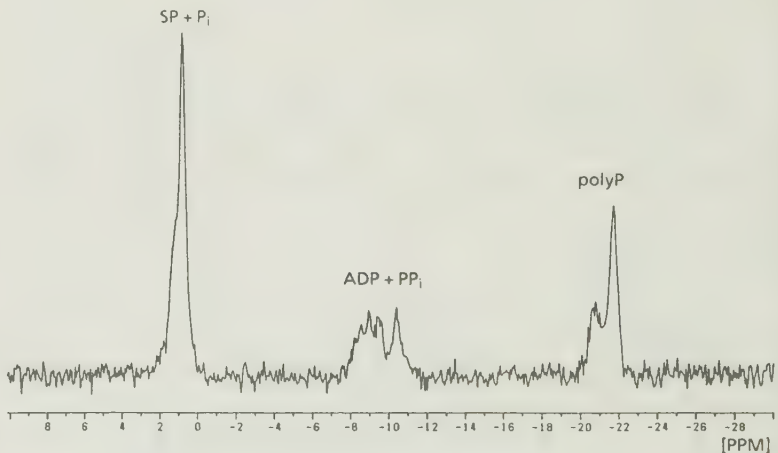


Abbildung 5-11: Trichloressigsäureextrakt einer anaeroben Suspension von *Platymonas* (1.800 Scans aufgenommen in 30 min bei pH 4,2)

Die colorimetrisch bestimmten Phosphatkonzentrationen liegen trotz des um den Faktor 10 höheren P_i -Gehaltes im Medium nicht signifikant über den mit NMR bestimmten bei Algen, die bei $0,3 \text{ mmol l}^{-1}$ und darunter liegenden Mengen von P_i gewachsen sind. Der Grund kann darin liegen, daß bei zu hohen Phosphatkonzentrationen die Aufnahme verringert wird. Wachstumshemmende Wirkungen zu hoher Phosphatgehalte im Medium sind bekannt (Kuhl 1974).

Die dargestellte Ähnlichkeit der NMR-Daten mit den Ergebnissen einer chemischen Analyse läßt den Schluß zu, daß die zellulären Phosphate

weitgehend NMR-sichtbar sind. Es sind zwar Reservoirs von spektroskopisch unsichtbarem Phosphor zu erwarten, vor allem gebunden in Phospholipiden sowie an wenig mobile Makromoleküle wie Ribonukleinsäuren und extrem langkettige Polyphosphate; sie sind aber offenbar nicht groß gegen die Menge sichtbarer Phosphorverbindungen.

Bei Spektren, die ohne konzentrationsgeeichten Standard gemessen worden sind, lassen sich die Konzentrationen von Metaboliten nicht absolut, aber relativ zueinander angeben.

In Tabelle 5-3 sind die relativen Konzentrationen von Phosphatmetaboliten, die aus den Spektren in Abbildung 5-6 (Probe A) und Abbildung 5-8 (Probe B) ermittelt worden sind, in willkürlichen Konzentrationseinheiten (KE) angegeben. Diese Einheiten sind für jede Probe so gewählt, daß die Summe der Phosphatmengen ohne polyP im energiearmen Spektrum 30 Einheiten entspricht. Der numerische Faktor von 30 entspricht einem mittlerem Wert der Phosphatkonzentrationen nach Abbildung 5-9 in mmol l^{-1} , das heißt einer typischen Konzentration intrazellulärer Phosphate ohne polyP. Eine K-Einheit (KE) kann daher als ungefähre absolute intrazelluläre Konzentration von 1 mmol l^{-1} angesehen werden, wenn die Zellen unter typischen Bedingungen gewachsen sind.

Der Vergleich der Konzentrationen bei verschiedenen Stoffwechselbedingungen zeigt, daß neben den Änderungen bei P_i , PArg und ATP die Variationen der anderen Metaboliten zu klein beziehungsweise zu uneinheitlich sind, um signifikant zu sein.

Charakteristisch für den Übergang von stickstoffbegasten zu aeroben Suspensionen ist der Rückgang des P_i -Signals auf 75 bis 50 % seiner vorherigen Intensität und das Auftauchen von PArg. Der Anstieg von ATP ist sowohl am γ - wie auch am β -Signal erkennbar. Wenn man annimmt, daß die Höhe des β -Signals von ADP auch in energiereichen Spektren ablesbar ist, und zwar an der hochfeldseitigen Schulter der Resonanz des terminalen ATP-Phosphats, und daß die Linienbreite der ADP-Signale in anaeroben und aeroben Zellen etwa gleich ist, kann die Konzentration von ADP auch in belüfteten Zellen näherungsweise angegeben werden. Ebenso kann die Menge von NAD(H) aus der Schulter am gemeinsamen α -Signal von ATP und ADP ermittelt werden. Die Intensität des α -Signals stimmt in Tabelle 5-3 meist bis auf etwa 10 % mit der

Tabelle 5-3: Phosphatsignalintensitäten und Phosphorylierungspotential (in Konzentrations-Einheiten¹⁾)

	SP	P _i	PD	PARg	ATP-γ	ADP-β	ADP/ ATP-α	NAD(H)	ATP-β	polyP	P _{total} ./ polyP	I ⁴⁾	AEC ⁴⁾
Probe A:													
+ N ₂ , dunkel	10,1	9,7	3,2	0	0,97	1,05	2,04	2,37	0,62	65,4	95	0,095	0,74
+ O ₂ , dunkel	7,0	3,9	3,9	0,67	2,13	0,80	3,00	2,37	1,51	65,4	91	0,68	0,86
+ N ₂ /CO ₂ , belichtet	7,8	6,7	3,9	0	2,00	<0,75> ²⁾	2,75	1,98	1,44	51,6	78	0,40	0,86
+ O ₂ /CO ₂ , belichtet	8,2	2,9	4,5	0,67	2,67	0,80	4,65	1,89	2,00	60,2	89	1,15	0,88
Probe B:													
+ N ₂ , dunkel ³⁾	9,6	7,1	4,7	0	1,70	1,05	3,00	1,71	1,07	13,7	43,7	0,23	0,81
+ Luft, dunkel	9,2	5,3	3,3	1,73	2,21	0,94	3,77	1,80	1,87	12,4	42,5	0,44	0,85
+ N ₂ /CO ₂ , belichtet ³⁾	10,4	6,7	3,9	<0,7	2,35	1,16	3,70	1,60	1,26	14,8	45,9	0,30	0,83
+ Luft, belichtet	11,8	5,4	4,5	1,79	2,33	1,11	3,72	1,80	1,87	12,7	47,0	0,39	0,84
Streuung ³⁾	0,5	0,5	0,5		0,2	0,2	0,15	0,15	0,15	~10%			

Anmerkung: Probe A: Spektren in Abb. 5-6; Probe B: Entsprechend Suspensionen in Abb. 5-8

1) Eichwert: P_{total} ./ polyP auf 30 Konzentrations-Einheiten gesetzt

2) Wert nicht meßbar; Schätzwert aus der Differenz C(ADP/ATP-α) und C(ATP-β)

3) Mittelwert aus je 2 Messungen; Abweichungen der ermittelten Werte aus verschiedenen Messungen unter gleichen Bedingungen als Streuung angegeben (aufgerundet)

4) [ATP] bei ATP-γ, [ADP] bei ATP-β abgelesen, [AMP] = 0 gesetzt.

Summe der Intensitäten des ATP- γ -Signals und des ADP- β -Signals überein. Dies spricht dafür, daß die ATP-Konzentration am γ -Signal genauer ablesbar ist als am β -Signal, das eine um etwa 30 % kleinere Konzentration anzeigt. Das β -Signal sitzt auf der Flanke des breiten polyP-Signals, weshalb die Bestimmung seiner Fläche mit zusätzlichen Fehlern behaftet ist.

Die Zunahme der Menge von ATP in energiereichen Zellen wird nicht durch eine entsprechende Verkleinerung des ADP-Signals ausgeglichen, so daß die Gesamtkonzentration an freien Di- und Triphosphatnukleosiden um größenordnungsmäßig 1 K-Einheit über der in energiearmen Zellen liegt. Ob die Menge von Monophosphatnukleosiden entsprechend abnimmt, kann aus dem relativ zu den erwarteten Änderungen großen Monoestersignal nicht abgelesen werden.

Wegen des uneinheitlichen Verhaltens des SP-Signals und der nur grob bestimmbaren Mengen von Phosphat in der Region der Diester, in der zum Beispiel auch PEP auftritt, führt eine genaue Bilanz für die Phosphate beim Übergang von energiearmen zu energiereichen Spektren für unterschiedliche Suspensionen zu uneinheitlichen Ergebnissen.

Sianoudis (1986) hat darauf hingewiesen, daß eine ausgeglichene Bilanz nicht zwingend zu erwarten ist. Die Existenz von Reservoiren spektroskopisch unsichtbarer Phosphate, die bei den untersuchten Übergängen von einem Zustand des Metabolismus in einen anderen Zustand Phosphatmetabolite in das Reservoir sichtbarer Phosphatverbindungen entlassen oder aus ihm aufnehmen, ist wahrscheinlich. Beispielsweise ist ADP in glykolysierenden Zellen zu einem großen Teil enzymatisch gebunden (Goller et al. 1982) und damit im NMR-Spektrum unsichtbar. Phosphorylierung von ADP zu ATP hebt die Enzymbindung auf, wodurch die Menge der insgesamt mobilen, sichtbaren Nukleotide vergrößert wird. Dieser Interpretation folgend wird beim Schritt von energiereichen zu energiearmen Zellen ADP immobilisiert, wodurch auch die Menge der sichtbaren Nukleotide abnimmt.

Aus den vorliegenden Daten kann dies jedoch nicht eindeutig abgeleitet werden. Eine ausgeglichene Bilanz bezogen auf die Phosphatreste kann nicht ausgeschlossen werden.

Findly et al. (1983) haben ^{31}P -NMR-Spektren am Ziliaten *Tetrahymena* aufgenommen, um Hitzeschockreaktionen zu untersuchen. Nach dem Hitzeschock erhielten sie Spektren, die energiearmen Zuständen - mehr P_i , weniger ATP - entsprechen. Beim Vergleich mit unter Normalbedingungen aufgenommenen Spektren ist die Phosphatbilanz ausgeglichen; die Menge an Phosphat, das an ADP und an ATP gebunden ist, ist in den energieärmeren Spektren deutlich verringert, die Menge an P_i hat entsprechend zugenommen. Da in diesen Spektren kein entsprechend vergrößertes Signal von AMP existiert, stellen Findly und Mitarbeiter eine totale Hydrolyse der Nukleotide zu Nukleosid und P_i zur Diskussion.

Eine unmittelbare Vergleichbarkeit von Spektren vor und nach Hitzeschock an *Tetrahymena* mit dem reversiblen Übergang von Atmung zur ausschließlichen Glykolyse an *Platymonas* ist sicher nicht gegeben. Gleichwohl kann die Wirkung ähnlicher Regulationsmechanismen in beiden Organismen unter den gegebenen Umständen nicht a priori ausgeschlossen werden: Wenn Hitzeschockreaktionen durch pH-Erniedrigungen induziert werden, wie dies für Hefe vermutet wird (Weitzel et al. 1985), könnten auch die mit dem Übergang zur Glykolyse einhergehenden pH-Absenkungen vergleichbare Stoffwechselumstellungen hervorrufen.

5.5.2.3 Kennzahlen des Energiehaushaltes

Die Verfügbarkeit phosphatgebundener Energie in einer Zelle wird allgemein durch zwei verschiedene Kennzahlen charakterisiert, durch das Phosphorylierungspotential Γ und den Energieinhalt des Adenylat-Systems (Adenylate Energy Charge, AEC).

Das Phosphorylierungspotential Γ hängt von Nukleotid- und Phosphatkonzentrationen ab nach

$$\Gamma = \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{P}_i]} \quad . \quad (5.1)$$

In Verbindung mit der Änderung der Freien Energie unter Standardbedingungen ΔG_0 der Hydrolyse von ATP gibt Γ die Energie an, die an einer ATPase pro Hydrolyse verfügbar ist. Γ ist damit zum Beispiel ein Maß für die von ATP-getriebenen Pumpen überwindbare Potentialdifferenz.

In Einheiten von $\text{KE}^{-1} \cdot 10^3$ ist Γ in Tabelle 5-3 angegeben. Mit gebotener Vorsicht kann dieser Wert als Maß für Γ in üblichen Einheiten ($\text{mol l}^{-1})^{-1}$ angesehen werden. Die so berechneten Werte sind auf das totale Zellvolumen bezogen. Tatsächlich steht für Reaktionen des ATP/ADP-Systems in wässriger Lösung nur ein kleineres Volumen zur Verfügung, das eher durch das osmotische Volumen als durch das totale Volumen angegeben wird. Es beträgt für Zellen, die in $0,4 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl}$ gewachsen sind, nur etwa 37 % des totalen Volumens. Die Konzentration der beteiligten Reaktionspartner ist entsprechend höher anzusetzen, Γ wäre entsprechend niedriger.

Die Verteilung der Nukleotide auf die verschiedenen Zellkompartimente ist nicht bekannt, so daß über lokal unterschiedliche Potentiale keine Aussage gemacht werden kann. Unterschiede sind vor allem zwischen Cytoplasma und Chloroplast zu erwarten, zwischen denen Nukleotide im allgemeinen nicht ausgetauscht werden.

Bei der marinen Alge *Acetabularia mediterranea* wurden mit biochemischen Methoden (Luciferin-Luciferase-Test) unterschiedliche Werte Γ für den Chloroplasten und das Cytosol bestimmt (Goldfarb et al. 1984a: $\Gamma = 745 (\text{mol}^{-1} \text{ l}^{-1})^{-1}$ im Cytosol, $\Gamma = 365 (\text{mol}^{-1} \text{ l}^{-1})^{-1}$ im Chloroplasten von in Seewasser gewachsenen Algen. Im niedrigeren Potential im Chloroplasten spiegelt sich wahrscheinlich die suboptimale Belichtung des Chloroplasten zum Zeitpunkt der Extrakterzeugung zur ATP-Bestimmung wider). Die unterschiedlichen Phosphorylierungspotentiale von Chloroplast und Cytosol beruhen vor allem auf unterschiedlichen ADP-Konzentrationen ($0,8 \text{ mmol l}^{-1}$ im Chloroplasten, $0,08 \text{ mmol l}^{-1}$ im Cytosol), während die Konzentrationen des Phosphats und der übrigen Nukleotide insgesamt vergleichbar mit den Konzentrationen bei *Platymonas* sind.

Eine zusätzliche Unsicherheit bei der Bestimmung von Γ aus NMR-Spektren entsteht dadurch, daß enzymgebundenes ADP unsichtbar ist. Wenn es durch die Bindung nicht an der Reaktion mit P_i gehindert wird, müßte es dennoch bei der Bestimmung des Phosphorylierungspotentials einbezogen werden.

Ein weiteres oft gebrauchtes Maß für den Energiezustand von Zellen ist der Energieinhalt. Er gibt an, inwieweit das Adenylatsystem aus AMP,

ADP und ATP mit "energiereichen" Phosphatgruppen gefüllt ist. Es wird angenommen, daß er ein wichtiger Faktor bei der Regulation ATP-bildender und ATP-verbrauchender Stoffwechselprozesse ist (Bomsl und Pradet 1968, Chapman und Atkinson 1977). Das Gleichgewicht wird bei unterschiedlichen Zelltypen offenbar bei einem Energieinhalt von etwa 0,85 erreicht (Lehninger 1985).

Der Energieinhalt hängt nicht von den absoluten Konzentrationen, sondern von Konzentrationsverhältnissen ab:

$$AEC = \frac{1}{2} \frac{[ADP] + 2[ATP]}{[AMP] + [ADP] + [ATP]} \quad . \quad (5.2)$$

Die in Tabelle 5-3 angegebenen Werte stellen obere Schranken für AEC dar. AMP wurde im Spektrum nicht identifiziert und seine Konzentration - die einen Term im Zähler darstellt - wurde nicht berücksichtigt. Bei der in vergleichbarem Milieu lebenden marinen Alge *Acetabularia* wurde eine AMP-Konzentration von $0,25 \text{ mmol l}^{-1}$ - bezogen auf das gemeinsame Volumen von Cytoplasma und Chloroplasten - gemessen. AEC liegt in diesem Volumen bei 0,74 bis 0,79 (Goldfarb et al. 1984a). Da die übrigen Nukleotidkonzentrationen und die Phosphatkonzentration mit den Meßwerten bei *Platymonas* vergleichbar sind, liegt vermutlich auch AMP in *Platymonas* in ähnlicher Konzentration wie in *Acetabularia* vor. Wenn der Energieinhalt mit einem angenommenen $[AMP] = 0,25 \text{ mmol l}^{-1}$ für *Platymonas* berechnet wird, erhält man Werte, die um $0,6 \pm 0,1$ unter den in Tabelle 5-3 jeweils angegebenen Werten liegen. Sie entsprechen dann dem für *Acetabularia* berechneten AEC.

5.5.3. Diskussion des Energiestoffwechsels von *Platymonas* bei verschiedenen Meßbedingungen

5.5.3.1 Leistungsbedarf und Leistungsvermögen von Zellen

Im folgenden soll diskutiert werden, welche Zustände des Energiestoffwechsels die verschiedenen Erscheinungsformen der Spektren verursachen. Es wird gezeigt, daß "energiereiche" und "energiearme" Spektren mit zwei gut charakterisierbaren Stoffwechselzuständen korrespondieren, die mit spezifischen Leistungen verbunden sind, welche der Zelle zur Verfügung stehen. Daraus ergeben sich zusätzliche experimentelle Möglichkeiten, zum Beispiel bei der Untersuchung von zellulären Regu-

lationsmechanismen: Auf spezielle Stimuli wird eine Zelle abhängig von ihrer momentanen Leistung unterschiedlich reagieren. Der Vergleich von Antworten der Zelle auf Umwelteinflüsse bei unterschiedlichen verfügbaren Leistungen erlaubt Schlüsse insbesondere bezüglich des Leistungsbedarfs des Regelungsmechanismus.

Die Alge *Platymonas subcordiformis* benötigt wie jedes lebende System Energie zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen. Als autotropher Organismus deckt sie ihren Bedarf an Primärenergie durch die Verwertung von einfallendem Sonnenlicht in ihrem Photosynthesystem. Mit der aus dem Licht gewonnenen Energie werden die notwendigen Stoffwechselvorgänge betrieben. Der den momentanen Bedarf übersteigende Anteil der Energie wird dazu verwendet, aus Kohlendioxid und Wasser energiereiche Kohlenwasserstoffverbindungen - vor allem Stärke - zu synthetisieren. Bei Abwesenheit der externen Energiequelle - im Dunkeln - wird die als Stärke gespeicherte Reserveenergie wieder mobilisiert. Ihre Umwandlung in phosphatgebundene Energie erfolgt mit unterschiedlicher Effektivität durch Atmung (in Verbindung mit vorgeschalteter Glykolyse) oder - im Anaeroben - durch Glykolyse allein.

Die unterschiedlichen Erscheinungsformen der Spektren von aeroben und anaeroben Zellsuspensionen werden mit "energiereich" und "energiearm" bezeichnet, weil die Spektren unterschiedlich große ATP-Signale aufweisen. Die Größe des ATP-Signals ist ein Maß für die in Form von Phosphatgruppen mit hoher Bindungsenergie in der Zelle vorhandene Energie. Die momentane ATP-Konzentration in einer Zelle wird jedoch durch das Fließgleichgewicht von ATP-erzeugenden und ATP-verbrauchenden Reaktionen bestimmt. Der wesentliche Unterschied zwischen verschiedenen "Energiezuständen" liegt daher in der Leistung, die die Zelle aufbringen kann; sie hängt von der pro Zeiteinheit erzeugten Menge ATP ab.

Der Leistungsbedarf einer Zelle beruht auf Prozessen, die in vier Kategorien eingeteilt werden können:

1. Prozesse zur unmittelbaren Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit des Organismus (Grundumsatz: Aufrechterhaltung des Zustandes hoher Ordnung beziehungsweise niedriger Entropie, der ein lebendes System auszeichnet; Abwehr von zerstörenden Einflüssen der Umwelt; Reparaturprozesse).

2. Prozesse des Zellwachstums (Erniedrigung der Entropie durch Vergrößerung der geordneten Struktur: Aufbau von Biomasse durch Fixierung von niedermolekularen Substanzen in Makromolekülen).
3. Prozesse zum Aufbau von Energiespeichern (Fixierung von CO_2 zu Stärke, eventuell Fixierung von Phosphaten zu Polyphosphat).
4. Prozesse zur Optimierung der Energiegewinnung (vor allem durch mechanische Arbeit: Flagellenbewegung).

Den Leistungsbedarf für eine Modellalge hat Raven (1982) abgeschätzt. Die Werte für eine Alge von 5 μm Durchmesser sind in Tabelle 5-4 dargestellt. Die Abschätzungen beziehen sich auf eine Süßwasseralge, sie sind aber dennoch auf *Platymonas* übertragbar; dem zusätzlichen Leistungsbedarf für die Aufrechterhaltung eines Na^+ -Gradienten über die Zellmembran, der bei marinen Algen anzunehmen ist, steht ein verringerter Leistungsbedarf zur Aufrechterhaltung osmotischer Druckdifferenzen gegenüber. Oberfläche und Volumen einer *Platymonas*-Zelle stimmen etwa mit denen der Modellzelle überein.

Tabelle 5-4: Leistungsbedarf einer einzelligen Mikroalge

Grundbedarf	$5,4 \cdot 10^{-14} \text{ W}$
Wachstumsleistung (für eine typische Wachstums- rate $8 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$)	$39,1 \cdot 10^{-12} \text{ W}$
Leistungen für Flagellenbewegung:	
- Schlagfrequenz 10 Hz	$2,2 \cdot 10^{-14} \text{ W}$
- Schlagfrequenz 100 Hz	$2,2 \cdot 10^{-13} \text{ W}$

(nach Raven 1982; Daten für eine Zelle mit Radius 5 μm ,
Oberfläche $314 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2$, Volumen $524 \cdot 10^{-18} \text{ m}^3$)

Zum Vergleich: Leistung von *Platymonas*

bei Atmung	$9,7 \cdot 10^{-13} \text{ W}$
bei Glykolyse	$4,9 \cdot 10^{-14} \text{ W}$
H^+ -Produktion bei Glykolyse	$1 \cdot 10^{-18} \text{ mol s}^{-1}$

(Abschätzung nach Kap. 5.5.3.2)

Dem Leistungsbedarf steht das Leistungsvermögen der Zelle gegenüber, das bei Photosynthese, Atmung und Glykolyse unterschiedlich ist.

Optimale Wachstumsbedingungen herrschen bei Photosynthese. Bei guter Belichtung ist der Energieumsatz pro Zeit ausreichend, um außer der Deckung des Grundbedarfes auch Zellwachstum und Aufbau von Energiereserven zu ermöglichen.

Im Dunkeln ist ein Aufbau von Energiereserven in autotrophen Organismen grundsätzlich nicht möglich. Die mobilisierbaren Stärkereserven liefern aber hinreichend Energie pro Zeiteinheit für den Grundbedarf sowie einige weitere Prozesse, wenn die Stärke bei Anwesenheit von Sauerstoff vollständig zu CO_2 und Wasser veratmet werden kann. Bei Abwesenheit von O_2 kann die Stärke nur glykolytisch abgebaut werden. Die Stabilität der Zellen auch bei längerer Anaerobiose zeigt, daß der Grundbedarf gedeckt ist.

5.5.3.2 Die Abschätzung der Leistung von *Platymonas* unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Der Energietransport in der Zelle wird im wesentlichen durch das Adenylatsystem vermittelt: ADP nimmt Energie auf, indem es zu ATP phosphoryliert wird. Energieverbrauchende Prozesse gewinnen diese Energie mit unterschiedlichen Wirkungsgraden aus der Hydrolyse von ATP zu ADP zurück.

In den Spektren ist der globale ATP- und - mit Einschränkungen - ADP-Gehalt der Zellen sichtbar. Da anhand der Spektren keine Aussagen über die Kompartimentierung der Nukleotide gemacht werden können, sind auch lokale Werte des Phosphorylierungspotentials nicht bekannt.

Die meßbare ATP-Menge in der Zelle gibt zunächst nur die stationären Energiereserven an, über die die Zelle nach dem vollständigen Abschalten ATP-liefernder Prozesse noch verfügen würde.

Im Normalfall konstanter Bedingungen ergibt sich die ATP-Konzentration aus dem Fließgleichgewicht von ATP-Zufuhr und -Verbrauch. Wahrscheinlich werden ATP-verbrauchende Prozesse so geregelt, daß die ATP-Menge auch ein Maß für den ATP-Verbrauch pro Zeiteinheit, also

für die von der Zelle verbrauchte Leistung ist. Hier wären noch genauere Untersuchungen erforderlich. Eine direkte Messung des ATP-Umsatzes durch kernspinspektroskopische Methoden, zum Beispiel durch Markierung (d.h. Sättigung) des Spins von γ -ATP und Untersuchung des Austausches mit P_i ("Sättigungsübertragung") ist in Algensuspensionen mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden (Überlagerung von γ -ATP und β -ADP, unbekannte Kompartierung von ATP, schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis etc). Für die beiden definierbaren Versorgungssituationen Atmung im Dunkeln und Glykolyse im Dunkeln lassen sich für *Platymonas* aber einige Aussagen machen.

Der ATP-Umsatz ist abschätzbar aus dem Sauerstoffverbrauch bei der Atmung. Pro 6 mol O_2 wird 1 mol Glukose aus Stärke abgespalten und zu 6 mol CO_2 und 6 mol H_2O abgebaut; dabei werden 36 mol ATP gebildet (einschließlich des bei der vorgeschalteten Glykolyse gebildeten ATP sowie unter der Annahme, daß auch cytoplasmatisches NADH in ATP umgesetzt wird; Lehninger 1985). Die Veratmungsrate für eine typische Zellsuspension unter Meßbedingungen wird in Kapitel 5.3. berechnet. Sie beträgt etwa $2 \text{ mg } O_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$, bezogen auf die gesamte Zellsuspension von 5 ml. Davon waren 15 % ($\hat{=}$ 750 μl) Zellvolumen. Bezogen auf dieses Zellvolumen lag der Sauerstoffverbrauch bei $13 \text{ mg } O_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$, das entspricht $6,9 \text{ } \mu\text{mol } O_2 \text{ l}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Bei Veratmung dieser Menge Sauerstoff werden $41,4 \text{ } \mu\text{mol ATP l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ erzeugt. Die Hydrolyse von 1 mol ATP setzt unter in vivo-Bedingungen (Γ um 600 Mol l^{-1} , Mg^{2+} -komplexierte Nukleotide) eine freie Energie von etwa 53 kJ frei (Lehninger 1985). Die für die Zellsuspension berechnete ATP-Erzeugung ermöglicht demnach eine Leistung von $2,2 \text{ W l}^{-1}$, bezogen auf das Zellvolumen. Eine einzelne Zelle hat ein Volumen von $440 \cdot 10^{-15} \text{ l}$, sie kann demnach bei Atmung eine Leistung von $9,7 \cdot 10^{-13} \text{ W}$ durch Hydrolyse des gebildeten ATP aufbringen ($\hat{=}$ $1,8 \cdot 10^{-17} \text{ mol ATP s}^{-1}$ pro Zelle). Dies gilt, solange die Energiereserven in Form von Stärke vorhanden sind; bei den in dieser Arbeit dargestellten Spektren ist dies stets der Fall.

Durch Glykolyse im Anaeroben werden pro abgespaltenem Glukosemolekül nur zwei Moleküle ADP zu ATP phosphoryliert. Über die Geschwindigkeit von Glykolyse bei pH-Erniedrigung des Cytoplasmas, die üblicherweise mit Anaerobiose einhergeht, liegen unterschiedliche Daten vor. Bei unterschiedlichen Organismen wurden sowohl eine verringerte Aktivität (Roos und Boron 1981) als auch gleichbleibende oder erhöhte

Aktivität (Hochachka und Mommsen 1983) gemessen. Daher wird für die Abschätzung der Leistung in *Platymonas* angenommen, daß die Glykolyse im Anaeroben etwa so schnell verläuft wie bei der Atmung. Dann entstehen $2,3 \mu\text{mol ATP l}^{-1} \text{ s}^{-1}$, bezogen auf das Zellvolumen. In einer einzelnen Zelle werden dementsprechend $1,0 \cdot 10^{-18} \text{ mol ATP s}^{-1}$ gebildet. Bei einem Γ von $100 (\text{mol l}^{-1})^{-1}$ bis $200 (\text{mol l}^{-1})^{-1}$ ist die Hydrolyseenergie etwa 4 kJ mol^{-1} niedriger als bei Atmung mit $\Gamma \approx 600 \text{ mol}^{-1} \text{ l}$, das heißt 49 kJ mol^{-1} . Einer Zelle steht dann eine Leistung von $4,9 \cdot 10^{-14} \text{ W}$ phosphatgebundener Energie zur Verfügung.

Die Gegenüberstellung von verfügbarer Leistung und Leistungsbedarf nach Tabelle 5-4 zeigt, daß der Grundbedarf durch die glykolytische Phosphorylierung in etwa gerade gedeckt ist. Bei Atmung steht eine 18-mal größere Leistung zur Verfügung. Der Leistungsbedarf für volles Wachstum liegt um weitere zwei Größenordnungen höher. Die Leistung für eine schnelle Bewegung des Flagellenapparates kann jedoch aufgebracht werden. Unter diesen Bedingungen ist auch das PArg-Signal in den Spektren ausgeprägt, das möglicherweise ein Indikator für eine hohe Flagellenaktivität ist.

Wenn eine ausreichend starke und homogene Belichtung gewährleistet ist, kann durch Photosyntheseaktivität (bei Lichtsättigung) ein dritter Energiezustand der Zelle mit einer noch größeren Leistung (über dem Wachstumsleistungsbedarf liegend) erzeugt werden. Da die Photosynthesebedingungen unter NMR-Bedingungen aber nur schlecht definiert sind, wird dieser Zustand hier nicht betrachtet.

Bei diesen Gegenüberstellungen muß beachtet werden, daß verbrauchtes NAD^+ bei rein anaerober Glykolyse nur dann regeneriert wird, wenn das entstandene Pyruvat durch Gärungsvorgänge wieder reduziert wird. Der Mangel an oxidierten Äquivalenten des NAD^+/NADH -Systems kann bestimmte Stoffwechselvorgänge behindern, auch wenn die phosphatgebundene Leistung zur Energieversorgung dieser Vorgänge noch ausreicht. Die folgenden Untersuchungen gelten im engeren Sinne daher nur für ATP-getriebene Reaktionen. Reaktionen, die vor allem vom NAD^+/NADH -Gleichgewicht abhängen, können insoweit einbezogen werden, wie geeignete Mechanismen existieren, durch die unter Einsatz phosphatgebundener Energie das notwendige Gleichgewicht eingestellt werden kann. Der oxidative Pentosephosphatzyklus kann beispielsweise benötigte Reduktionsäquivalente bereitstellen.

5.5.3.3 Die Einstellung neuer Gleichgewichte nach Änderung der Gasversorgung

Unter der Annahme, daß die bei Glykolyse und Atmung spektroskopisch sichtbaren Mengen von ATP sich überwiegend dort befinden oder dorthin transportiert werden können, wo sie wahrscheinlich größtenteils verbraucht und bei Glykolyse auch erzeugt werden, nämlich im Cytoplasma (bei Atmung wird ATP aus den Mitochondrien in das Cytoplasma transportiert) kann eine Umsatzrate für das ATP angegeben werden: bei Atmung werden die intrazellulären Mengen an ATP - circa $8,8 \cdot 10^{-16}$ mol für eine durchschnittliche Zelle mit einem Volumen von $440 \cdot 10^{-15}$ l (nach Tab. 5-3) - in rund 1 min umgesetzt, bei Glykolyse allein - circa $4,4 \cdot 10^{-16}$ mol ATP pro Zelle - in etwa 8 min. (In sehr schnell wachsenden Organismen wie zum Beispiel *E. coli* liegen die ATP-Umsatzraten in der Größenordnung von Sekunden (Chapman und Atkinson 1977).)

Der Abbau des ATP nach einem Stopp der Atmung von etwa $8,8 \cdot 10^{-16}$ mol Zelle⁻¹ auf $4,4 \cdot 10^{-16}$ mol Zelle⁻¹ entspricht einer Verringerung der ATP-gebundenen Energie in der Zelle von $\sim 4,7 \cdot 10^{-11}$ J Zelle⁻¹ auf die Hälfte. Dieser Abbau erfolgt in 6 min, wenn die Zelle nur die Grundbedarfsleistung aufbringen muß. Bei einem Umschalten der Gasversorgung einer Algensuspension ist demnach eine Änderung der ATP-Konzentration innerhalb eines Zeitraumes von einigen Minuten zu erwarten. Der genaue zeitliche Verlauf hängt von der Regelung des ATP-Verbrauchs ab. Unter den gegebenen Meßbedingungen sind Spektren hinreichenden Signal-Rausch-Verhältnisses mit dieser zeitlichen Auflösung nur schwer zu erzielen. Darüberhinaus ist zu berücksichtigen, daß bei einem Umschalten von Luft- auf Stickstoffbegasung die Suspension erst nach etwa einer Minute vollständig sauerstofffrei ist.

Atmende Zellen enthalten außer Nukleotiden etwa 1 mmol PArg l⁻¹ Zellvolumen entsprechend $4,4 \cdot 10^{-16}$ mol Zelle⁻¹. Da das ΔG_0 von PArg mit $-32,2$ kJ mol⁻¹ nahe dem für ATP ($-30,5$ kJ mol⁻¹) liegt, wird angenommen, daß PArg in der Zelle eine ähnliche Menge phosphatgebundener Energie enthält wie die gleiche Menge ATP, nämlich ~ 53 kJ mol⁻¹. $4,4 \cdot 10^{-16}$ mol PArg enthalten dann eine Energie von $2,3 \cdot 10^{-11}$ J Zelle⁻¹.

Die polyP-Konzentration liegt in den betrachteten Suspensionen zwi-

schen 45 mmol l^{-1} und 90 mmol l^{-1} Phosphatmonomere, entsprechend $2 \cdot 10^{-14} \text{ mol}$ bis $4 \cdot 10^{-14} \text{ mol}$ pro Zelle. Die gespeicherte Energie pro Zelle beläuft sich bei einem geschätzten ΔG von -45 kJ mol^{-1} bei Hydrolyse auf $9 \cdot 10^{-10} \text{ J}$ bis $18 \cdot 10^{-10} \text{ J}$ (wegen $\Delta G_0 \approx -30 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die Abspaltung eines Phosphatmonomers; Lehninger 1985). Das ist das 12- bis 25-fache der als ATP und PArg gespeicherten Energie. Das scheint viel zu sein, aber diese Menge von Energie wird bei optimalem Wachstum in weniger als einer Minute umgesetzt. Die Konstanz des polyP-Signals zeigt, daß polyP unter Normalbedingungen auch nach dem Übergang von Atmung zu alleiniger Glykolyse nicht als Energiereserve für den Grundumsatz herangezogen wird. Die relativ kleine Menge gespeicherter Energie läßt die Rolle von polyP als Energiespeicher fragwürdig erscheinen. (Diese Aussagen gelten unter der Annahme, daß polyP weitgehend spektroskopisch sichtbar ist, das heißt, daß die totale Menge des polyP weniger als eine Größenordnung über der des sichtbaren polyP liegt.)

Die erneute Einstellung eines Fließgleichgewichtes mit konstantem ATP-Spiegel nach dem Umschalten der Begasung zeigt, daß der Verbrauch ATP-gebundener Energie vom ATP-Spiegel selbst oder einer von ihm abgeleiteten Größe gesteuert wird. Eine derartige Größe kann Γ sein; auch Γ seinerseits ist möglicherweise geregelt: da sich die von ATPasen leistbare Arbeit pro ATP-Hydrolyse mit sinkendem Γ verringert, sind Mechanismen vorteilhaft, die auch bei abnehmendem ATP-Spiegel das Absinken von Γ unter eine kritische Grenze verhindern. Das wird unter anderem dadurch bewirkt, daß die Konzentration freien ADPs nicht in dem Maße ansteigt, in dem ATP abnimmt, sondern - wie Tabelle 5-3 zeigt - nahezu gleich bleibt.

Es wird aber auch deutlich, daß das Verhalten der Zellen gegenüber Streßsituationen, die einen erhöhten Bedarf an ATP-transportierter Leistung hervorrufen, bei Atmung und Glykolyse unterschiedlich sein muß. Während bei Atmung - wie auch bei Photosynthese - noch erhebliche Leistungsreserven über den Leistungsgrundbedarf hinaus existieren, stoßen streßbedingte Stoffwechselvorgänge in glykolysierenden Zellen schnell an Leistungsgrenzen. Vergleichende Untersuchungen solcher Vorgänge unter beiden Stoffwechselbedingungen erlauben Rückschlüsse auf ihren Energiebedarf.

5.5.3.4 Die Einstellung des intrazellulären pH

Die ATP-Bildung durch Atmung ist im Fließgleichgewicht, wenn ATP-Hydrolyserate und -Bildungsrate gleich sind, in Bezug auf den pH neutral.

Bei ATP-Erzeugung allein aus Glykolyse werden durch Glykolyse und anschließende Hydrolyse von ATP $1,0 \text{ mol H}^+$ pro mol gebildetem ATP erzeugt (Busa und Nuccitelli 1984). Bei der oben abgeschätzten ATP-Bildungsrate von $1,0 \cdot 10^{-18} \text{ mol s}^{-1}$ werden pro Zelle auch $1,0 \cdot 10^{-18} \text{ mol H}^+ \text{ s}^{-1}$ produziert, entsprechend $6,2 \cdot 10^{-3} \text{ mmol H}^+ \text{ l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bezogen auf ein osmotisches Zellvolumen von $160 \cdot 10^{-15} \text{ l}$. (Während bei Metaboliten des Stoffwechsels vor allem die Menge pro Zelle interessant ist, ist bei der Berechnung von pH-Werten die tatsächliche Konzentration von Protonen und Hydroxylionen entscheidend. Daher werden Protonen- und Hydroxylionenkonzentrationen auf das osmotische Volumen der Zelle als ein Maß für das Volumen des Zellwassers bezogen.) Bei Abwesenheit von pH-Puffern und Protonenpumpen würden die produzierten Protonen den pH in 10 Sekunden auf 4,2 erniedrigen. Bei einer Pufferkapazität von $50 \text{ mmol H}^+ \text{ l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$, die ein typischer Wert für das Zellinnere ist (Roos und Boron 1981), würde die nach einem Übergang von Atmung zu Glykolyse beobachtete pH-Absenkung von 7,5 auf 7,1 in etwa einer Stunde erfolgen. Die bei diesem Übergang zusätzlich einmalig hydrolysierten $4,4 \cdot 10^{-16} \text{ mol ATP}$ pro Zelle erzeugen $3,5 \cdot 10^{-16} \text{ mol H}^+$ pro Zelle $\hat{=}$ $2,2 \text{ mmol H}^+ \text{ l}^{-1}$ osmotisches Volumen, entsprechend einer Produktion von $0,8 \text{ mol H}^+$ bei der Hydrolyse von 1 mol ATP unter intrazellulären Bedingungen (Busa und Nuccitelli 1984). Dies allein würde eine Absenkung des pH um nur 0,04 bewirken. Wenn außerdem eine zusätzliche Hydrolyse von ADP angenommen wird, kann die pH-Absenkung auch etwa doppelt so groß sein. Die pH-Absenkung ist daher nicht allein auf die Hydrolyse von Nukleotiden zurückzuführen, zusätzliche Vorgänge im Metabolismus müssen den intrazellulären pH steuern. Entsprechendes gilt beim Übergang von anaeroben zu aeroben Bedingungen: der pH-Anstieg ist nicht vollständig erklärbar aus der Bindung von Protonen durch erneut phosphorylierte Nukleotide.

Diese Annahme wird gestützt durch Untersuchungen an *Chlorella fusca* mit einer zeitlichen Auflösung von 16 s, die bei dieser Süßwasseralgel gelang (Sianoudis 1986). Nach 32 s Luftbegasung liegt die ATP-Konzen-

tration bereits im Bereich des Endwertes, während der pH-Wert des Cytoplasmas noch nicht erhöht ist.

Eine verringerte Leistungsfähigkeit von Plasmalemma-ATPasen bei Glykolyse, aufgrund der aus dem Medium in das Cytoplasma eindiffundierenden Protonen nicht mehr in ausreichendem Maße wieder aus dem Cytoplasma hinaus transportiert werden können, kommt nicht als Grund für die Ansäuerung in Betracht. In einem solchen Falle müßte pH_{int} sehr viel stärker von Änderungen von pH_{ext} abhängen, als dies tatsächlich der Fall ist (siehe Kap. 5.6.).

5.6. Der Stoffwechsel in Abhängigkeit vom pH im Medium

5.6.1 Einführung: Die Stabilisierung des intrazellulären pH

Die Aktivität vieler cytoplasmatischer Enzyme ist stark vom pH abhängig und viele Stoffwechselvorgänge werden durch Komplexe mehrerer Enzyme gesteuert. Daher ist es notwendig, daß der pH in der Nähe eines optimalen Wertes bleibt und daß starke Abweichungen von diesem Wert vermieden werden. Cytoplasmatische pH-Werte liegen zwischen 6,6 und 7,6 in intakten tierischen Nervenzellen, Muskeln und Blutzellen (Roos und Boron 1981). Gemessen wurden diese Werte mit verschiedenen Methoden wie Verteilung von DMO, Nicotin und CO_2 sowie ^{31}P -NMR und Verwendung pH-empfindlicher Elektroden. Auch in pflanzlichen Zellen liegt der cytoplasmatische pH um 7 ± 1 (*Nicotiana tabacum*: Wray et al. 1985, Mais: Roberts et al. 1980, *Lamprothamnium*: Kirst und Bisson 1982).

Mikroorganismen leben unter Bedingungen, bei denen äußere pH-Werte stark variieren können. Da sie eine große Oberfläche pro Volumen besitzen, sind sie gegen Umwelteinflüsse besonders "anfällig". Um eine ungünstige Beeinflussung des Stoffwechsels durch wechselnde externe pH-Werte zu vermeiden, müssen die Organismen über Mechanismen verfügen, die eine pH-Homöostase auch gegen von außen eindringende Protonen oder Hydroxylionen gewährleisten.

Busa und Nuccitelli (1984) vermuten, daß der intrazelluläre pH selbst als globaler Parameter für die Steuerung verschiedener zellulärer Vorgänge dient. Ein einfaches Regelsystem, das den pH unabhängig von der Ursache des Protonen- oder Hydroxyl-Zustroms auf einem festen Sollwert stabilisiert, stünde hierzu im Widerspruch. Die Steuerungsrolle ist nur erfüllbar, wenn der cytoplasmatische pH tatsächlich nur von den Stoffwechselvorgängen bestimmt wird, die die Antwort auf den jeweiligen pH darstellen sollen. pH-Änderungen durch Umwelteinflüsse müssen als nicht metabolisch bedingt erkannt und so gering gehalten werden, daß die Signalfunktion nicht gestört wird.

Platymonas subcordiformis muß als Brackwasserbewohnerin mit leistungsfähigen Regelmechanismen ausgestattet sein. Marine Organismen leben unter weitgehend konstanten Bedingungen bei pH 8,0 bis 8,4, dem

natürlichen pH von Meerwasser. Eine Brackwasseralge muß dagegen widerstandsfähig sein gegen Änderungen des Milieus, wie sie im Küstenbereich während der Tide auftreten können. Vor allem in kleinen Becken, die während des Trockenfallens der Umgebung bei Niedrigwasser übrigbleiben, können Salinität und pH variieren. Durch Zufuhr von Süßwasser, zum Beispiel durch Regen, kann in einem isolierten Becken nicht nur die Salinität, sondern auch der pH deutlich erniedrigt werden. Andererseits steigt der pH, wenn die Zellen photosynthetisch aktiv sind. Bei dichten Kulturen im Licht sind pH-Werte bis 11 festgestellt worden (Kirst, private Mitteilung).

Die pH-Homöostase ist bei einigen Süßwasseralgen untersucht worden. Lane und Burris (1981) haben pH_{int} mit der DMO-Methode als Funktion von pH_{ext} an *Chlorella pyrenoidosa* und *Scenedesmus quadricauda* bestimmt. Im untersuchten Bereich von pH_{ext} 3 bis 9 wird pH_{int} bei Werten zwischen 7 und 8 gehalten. Küsel (1987) hat *Chlorella fusca* und *Chlorella vulgaris* mit ^{31}P -NMR untersucht. Aerobe Zellen halten pH_{int} bei 7,2 bis 7,8 zwischen pH_{ext} 3 und 10. Anaerobe Zellen haben einen pH_{int} bei 6,5 unterhalb pH_{ext} 6 und um 7 bei hohen pH_{ext} bis 10.

Die euryhaline Alge *Lamprothamnium* hält pH_{int} noch bei sauren pH_{ext} von 5 stabil. Bei externem pH über 9 ist die pH-Homöostase nicht mehr wirksam (DMO-Messungen: Kirst und Bisson 1982).

Von verschiedenen Mechanismen wird vermutet, daß sie die pH-Homöostase bewirken. Dabei werden vor allem Systeme diskutiert, die Protonen eliminieren können, welche durch Stoffwechselvorgänge freigesetzt werden. Die Mechanismen lassen sich in drei Gruppen einteilen (Roos und Boron 1981):

- Pufferung durch Säure-Base-Systeme, die im Cytoplasma vorhanden sind
- Konsumption von Protonen oder Hydroxylionen durch spezielle Stoffwechselprozesse
- Transport von Protonen oder Hydroxylionen über Membranen aus dem Cytoplasma hinaus (in die Vakuolen oder in den extrazellulären Raum).

Während Systeme der ersten Kategorie passiv sind und keine ATP-ge-

bundene Energie verbrauchen, ist der Transport ein aktiver Prozeß. Vor allem bei Pilzen wird eine Plasmalemma-ATPase diskutiert, die ein oder zwei Protonen pro Hydrolyse eines ATP-Moleküls aus dem Zellinneren nach außen pumpt (Serrano 1984). Systeme der zweiten Kategorie können passiv sein und als einfache Puffer wirken; es sind aber auch energiefordernde Stoffwechselprozesse denkbar. Zu dieser Kategorie gehört das Malat-Dehydrogenase/PEP-Carboxylase-System, durch das pH_{int} in höheren Pflanzen stabilisiert wird (Davies 1973). Auch die Reduktion von Nitrat zu Aminogruppen bindet Protonen und wirkt einer Ansäuerung entgegen.

Im folgenden werden der intrazelluläre pH und Stoffwechselcharakteristika von *Platymonas*, soweit sie an den Spektren zu erkennen sind, bei verschiedenen pH-Werten des Mediums untersucht. Dabei werden Zellen geringer Leistung (glykolysierende Zellen) und solche größerer Leistung (atmende Zellen) miteinander verglichen. Außerdem wird eine Abschätzung der Pufferkapazität gegen alkalische Belastungen vorgenommen und der Einfluß von Protonophoren auf den intrazellulären pH betrachtet.

5.6.2 Der intrazelluläre pH

Durch Zugabe kleiner Mengen von HCl oder NaOH zum Medium wurde der äußere pH von Zellsuspensionen auf verschiedene Werte eingestellt. Er wurde vor und nach der Aufnahme von Spektren mittels einer Glas-Elektrode kontrolliert. Die Aufnahme eines Spektrums erfolgte etwa 10 min nach Einstellung vom pH_{ext} . Die totale Akkumulationszeit betrug 10 min.

Die Erscheinungsformen der Spektren blieben über einen weiten Bereich externer pH-Werte stabil. Insbesondere gilt dies für die typische pH-Differenz von etwa 0,4 zwischen dem Cytoplasma energiereicher und energiearmer Zellen. Der cytoplasmatische pH-Wert änderte sich zwischen pH_{ext} 5 und pH_{ext} 12 - über einen Bereich von 7 Einheiten - nur wenig (siehe Abb. 5-12).

Bei extremen äußeren pH-Werten verhielten sich anaerobe und aerobe Zellen unterschiedlich: in anaeroben Zellen scheint die pH-Stabilisierung des Cytoplasmas unterhalb pH_{ext} 6 weniger effizient gewesen zu sein

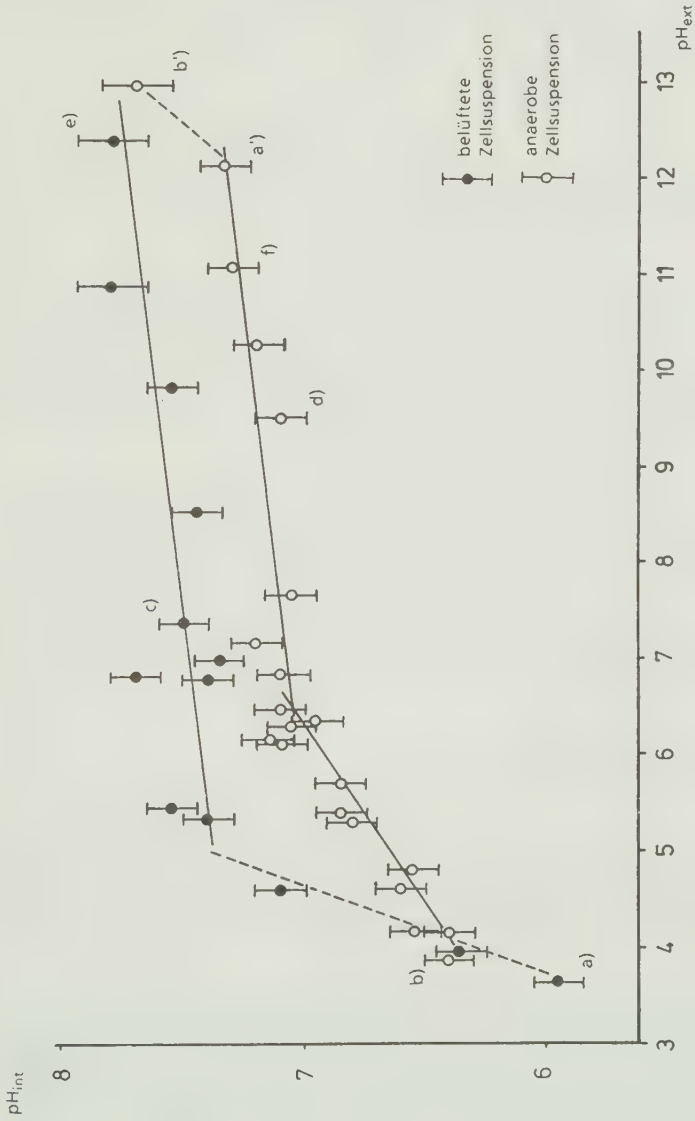


Abbildung 5-12: Der intrazelluläre pH als Funktion des pH im Medium

Daten von vier verschiedenen Proben; die Spektren der mit a - f gekennzeichneten Meßpunkte sind in Abbildung 5-14 dargestellt, die mit a' und b' gekennzeichneten Spektren in Abbildung 5-15 a) und b)

als im alkalischeren Medium. pH_{int} fiel auf etwa 6,4 bei pH_{ext} 4,1 von 7,0 bei pH_{ext} 6,5, in linearer Näherung ist das eine Steigung von 0,25 Einheiten pH_{int} pro Einheit pH_{ext} . Im Alkalischen stieg pH_{int} auf 7,3 bei pH_{ext} 12,1, entsprechend einer durchschnittlichen Steigung von 0,05 Einheiten $\text{pH}_{\text{int}}/\text{pH}_{\text{ext}}$.

In den belüfteten Suspensionen stieg pH_{int} von 7,5 bei pH_{ext} 5,3 auf 7,8 bei pH_{ext} 12,3, was ebenfalls einer mittleren Steigung von etwa 0,05 Einheiten $\text{pH}_{\text{int}}/\text{pH}_{\text{ext}}$ entspricht - wie in den anaeroben Suspensionen. Unterhalb pH_{ext} 3,8 fiel der innere pH auf 6.

Cytoplasmatische pH-Werte unter 6 sind schwer zu ermitteln. Der Abstand des P_i -Signals zum SP-Signal nimmt ab, und wegen der Linienbreite beider Signale ist die Bestimmung der Frequenz von P_i nicht mehr genau möglich. Außerdem ändert sich die Lage des P_i -Signals unterhalb pH 5 nicht mehr wesentlich mit dem pH.

Auch wenn das Medium der Suspension durch eine isotone Lösung von Sorbitol (ohne NaCl) ersetzt wird, verhält sich der intrazelluläre pH gegenüber saurem äußeren Medium grundsätzlich gleich. Das Absinken der Kurve des intrazellulären pH zu kleineren Werten, das heißt der Bereich geringerer Stabilität von pH_{int} , scheint allenfalls etwas zu niedrigerem externen pH - etwa eine halbe Einheit - verschoben zu sein (siehe Abb. 5-13).

5.6.3 Der Phosphatstoffwechsel

In Abbildung 5-14 sind Spektren "energiereicher" und "energieärmer" Zellen bei verschiedenen pH_{ext} einander gegenübergestellt. Abgesehen von den niedrigsten pH-Werten zeigen die Spektren die für ihren jeweiligen Zustand typischen Charakteristika.

Das Signal bei 0 ppm - im Extrakt befindet sich hier PEP - ist bei den anaeroben Suspensionen bei pH_{ext} über 11 deutlich vergrößert. Auch in Spektren atmender Zellen ist es bei alkalischem externen pH ausgeprägter als bei neutralem pH. Allerdings ist ein PEP-Signal in energiereichen Zellen auch unter normalen Bedingungen erkennbar.

Unterhalb pH_{ext} 4 sind Spektren anaerober und aerober Zellen nicht

mehr unterscheidbar. Der intrazelluläre pH liegt mit Werten um 6 bereits so niedrig, daß das P_i - und SP-Signal dicht aneinanderrücken. ATP- und ADP-Signale verschwinden vollständig. Das zeigt, daß die Energieproduktion durch Respiration geringer ist als der Verbrauch phosphatgebundener Energie in der Zelle. Das Fehlen von ADP kann - wie in Kapitel 5.5. diskutiert - auf Immobilisierung oder auf eine weitgehende Hydrolyse auch von ADP zurückzuführen sein.

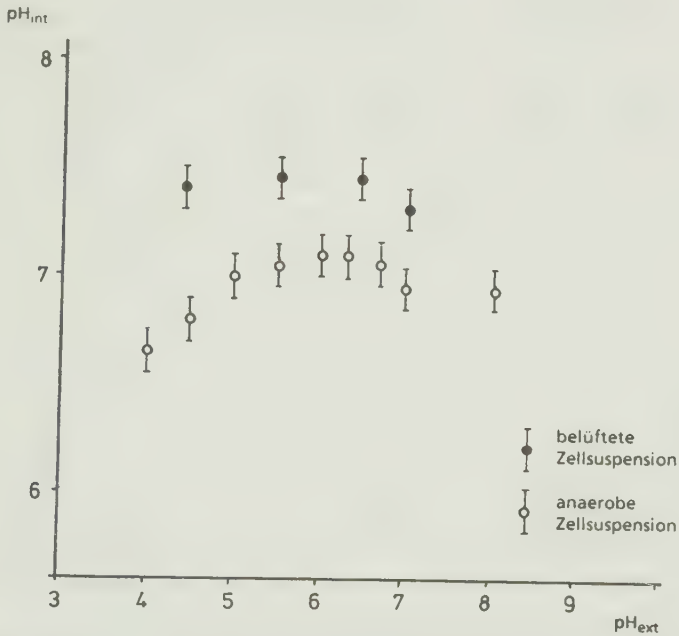


Abbildung 5-13: Der intrazelluläre pH als Funktion des pH im Sorbitmedium

Diese Veränderungen im Spektrum wie auch die starke Ansäuerung des Cytoplasmas sind reversibel. Nach Einstellen eines "normalen" pH im Medium von 7 oder 8 nehmen die Spektren sofort - das heißt innerhalb der Aufnahmedauer eines Spektrums von etwa 10 Minuten - wieder ihr typisches Aussehen für aerobe beziehungsweise anaerobe Suspensionen an.

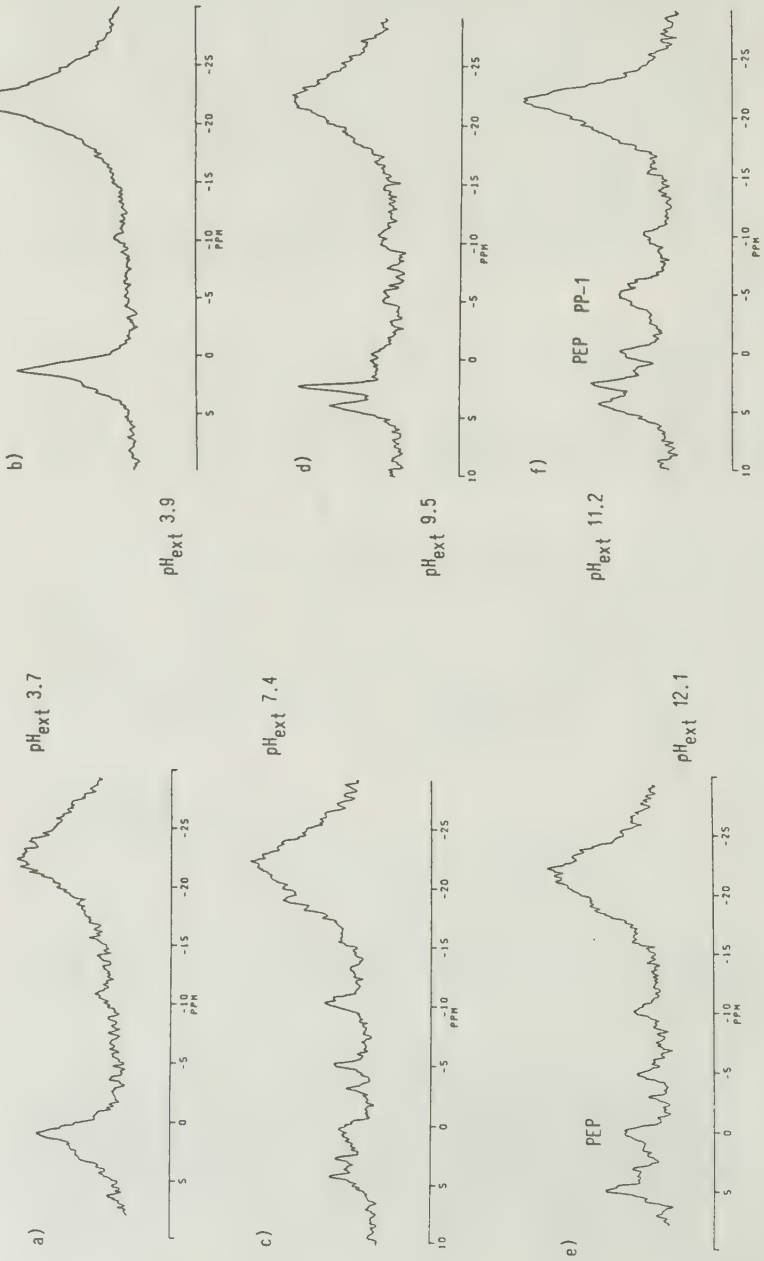


Abbildung 5-14: Spektren von belüfteten (links) und anaeroben (rechts) Zellsuspensionen bei verschiedenen pH_{ext}

Die Spektren von Suspensionen in reinem Sorbitol zeigen keine Abweichungen im Vergleich zu Spektren von Suspensionen mit normalen Ionenkonzentrationen im Medium. Bei niedrigem externen pH und nach abzentrifugieren der Zellen aus dem Sorbitol-Medium zeigt sich, daß P_i in das äußere Medium gelangt ist.

5.6.4 Das polyP-Signal bei alkalischem pH

Es gibt einen bemerkenswerten Unterschied zwischen belüfteten und mit Stickstoff begasten Zellen bei alkalischen äußeren pH-Werten, was polyP betrifft. In anaeroben Zellen stieg pH_{int} oberhalb pH_{ext} 12 über 7,3. Die polyP-Ketten begannen sich zu verkürzen, wie aus dem Anstieg eines Signals bei -5 ppm geschlossen werden kann (Abb. 5-15a). Dieses Signal stammt von Pyrophosphat und terminalen Gruppen (PP-1) von polyP. Ein Anstieg der terminalen und präterminalen Signale von polyP relativ zu den Mittelgruppen zeigt die Verkürzung der mittleren Kettenlänge an.

Eine weitere Alkalisierung des Mediums auf pH_{ext} 13 verstärkte den Zerfall von polyP. Ein Signal des präterminalen Phosphats PP-2 wuchs bei -19,5 ppm aus der hochfrequenten Flanke des polyP-Signals heraus. pH_{int} erreichte $7,7 \pm 0,1$ (Abb 5-15b).

Etwa 20 Minuten nachdem das Medium auf pH_{ext} 13 eingestellt worden war, wurden die Algen abzentrifugiert und in frischem Medium von pH_{ext} 8 resuspendiert. Das Spektrum (Abb. 5-15c) zeigt, daß nur wenig polyP übriggeblieben war. Das Signal bei -5 ppm ist deutlich größer als die Signale der nicht terminalen Phosphatgruppen. Es ist daher vor allem auf PP_i zurückzuführen. Komplexierung mit paramagnetischen Ionen, die zuvor an das polyP gebunden waren, kann ein Grund für die große Breite des Signals sein. Auch der P_i -Gehalt ist erheblich vergrößert. pH_{int} ist auf einen für energiearme Zellen normalen Wert von 6,95 zurückgekehrt. Die Untersuchung des abzentrifugierten alkalischen Mediums erwies, daß kein Phosphat aus den Zellen entwichen war. Die Algen waren noch zur oxidativen Phosphorylierung fähig, wie das Spektrum der belüfteten Suspension zeigt (Abb. 5-15d). pH_{int} ist nun 0,4 alkalischer und der erhöhte ATP-Spiegel ist deutlich am β -Signal zu erkennen.

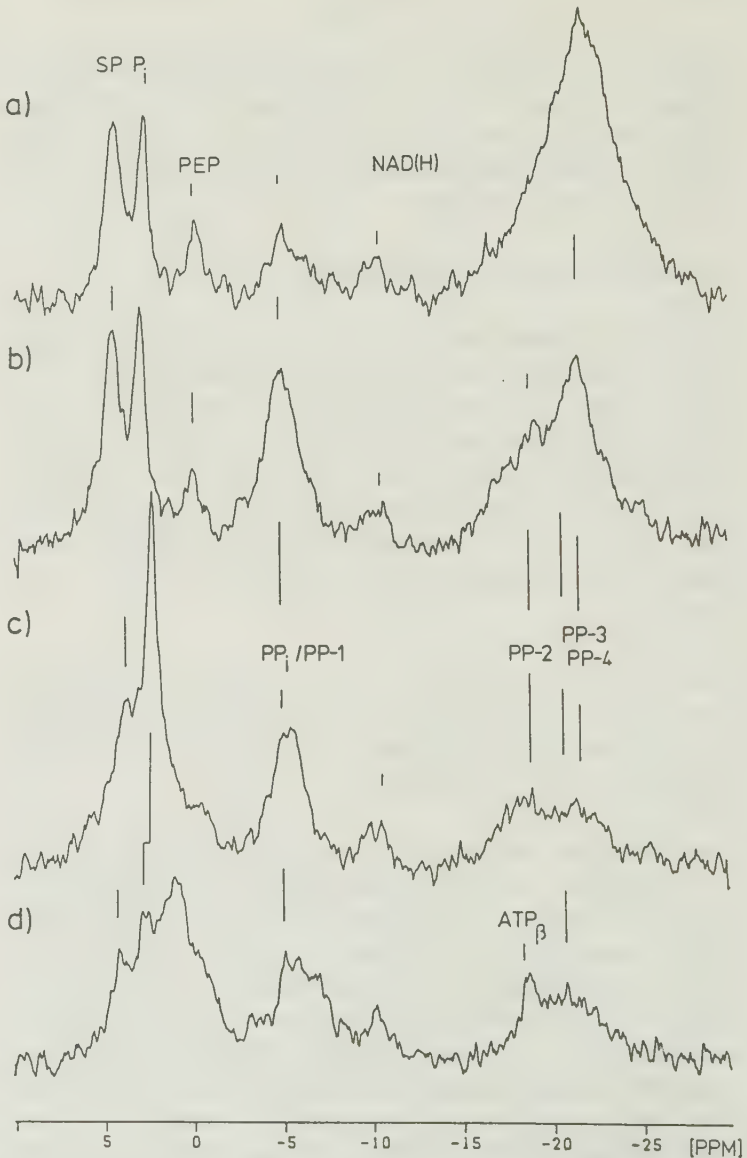


Abbildung 5-15: Spektren von Zellen bei alkalischer Belastung

- Zellsuspensionen im anaeroben bei $\text{pH}_{\text{ext}} 12,1$ mit erhöhtem PEP-Signal und vergrößertem Signal von terminalem polyP (PP-1)
- Dieselben Zellen bei $\text{pH}_{\text{ext}} 13,0$. Das Spektrum zeigt ein großes Signal von PP_i und PP-1 sowie eine deutliche Schulter von PP-2
- Dieselben Zellen, resuspendiert in frischem Medium bei pH 8 nach 20 min im alkalischen Medium
- Dieselben Zellen, mit Luft begast bei $\text{pH}_{\text{ext}} 8$. Das PP_i-Signal nimmt ab

In atmenden Zellen wird schon bei neutralem pH im Medium ein cytoplasmatischer pH_{int} über 7,4 erreicht. Trotzdem ist eine Veränderung des polyP-Signals auch bei alkalischem Medium und pH_{int} von 7,8 nicht zu beobachten (Abb. 5-14).

Das Verhalten des PP_i -Signals wird in Kapitel 6. weiter untersucht.

5.6.5 Die Wirkung von NH_4Cl und Entkopplern

Die Zugabe von 10 mM NH_4Cl zu einer anaeroben Suspension von *Platymonas* führte zu einer Alkalisierung des Cytoplasmas von pH_{int} 7,0 auf 7,25 (Abb. 5-16). Der pH blieb damit unter dem pH_{int} , der in energiereichen Zellen erreicht wird. Dennoch wird das polyP teilweise hydrolysiert, wie aus dem Anstieg des Signals bei -5 ppm zu schließen ist. Dieser Effekt entspricht der Hydrolyse von polyP in anaeroben Zellen bei leichter Alkalisierung des Cytoplasmas durch stark alkalisches Medium. Genauso wie bei jenen Zellen ist auch bei Alkalisierung des Cytoplasmas durch NH_4Cl ein ausgeprägtes Signal bei der Verschiebung des PEP vorhanden.

Die Pufferkapazität liegt - berechnet nach Gleichung (4.3) mit $\text{pH}_{\text{ext}} = 7,56$ - bei $80 \text{ mmol l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$. Der erhöhte pH_{int} war während mehrerer Messungen über insgesamt 30 min stabil; eine Aufnahme von NH_4^+ in das Cytoplasma über die durch das intrazelluläre Gleichgewicht von NH_3 und NH_4^+ bedingte Konzentration hinaus fand nicht statt. Eine derartige Aufnahme hätte sich durch ein langsames Absinken von pH_{int} bemerkbar gemacht.

In belüfteten Suspensionen führt die Zugabe von NH_4Cl zum Medium nicht zu einer Alkalisierung des Zellinneren. Stattdessen wird das Cytoplasma etwas angesäuert - um etwa 0,1 pH-Einheiten. Die partielle Hydrolyse von polyP ist wiederum am PP_i -Signal zu erkennen. Das Signal von β -ATP ist nach der Zugabe von NH_4Cl kleiner als vorher; gut ist dies beim Vergleich mit dem benachbarten NAD(H)-Signal zu erkennen (Abb. 5-17). Das zunächst unerwartete Absinken des pH_{int} dürfte damit erklärbar sein als Effekt des Übergangs vom energiereichen zu einem energieärmeren Zustand, möglicherweise bewirkt durch eine entkoppelnde Wirkung von intrazellulärem NH_4^+ auf die Mitochondrienmembran. Eine aktive Aufnahme von NH_4^+ darf aus der pH-Absenkung nicht unmittelbar gefolgert werden.

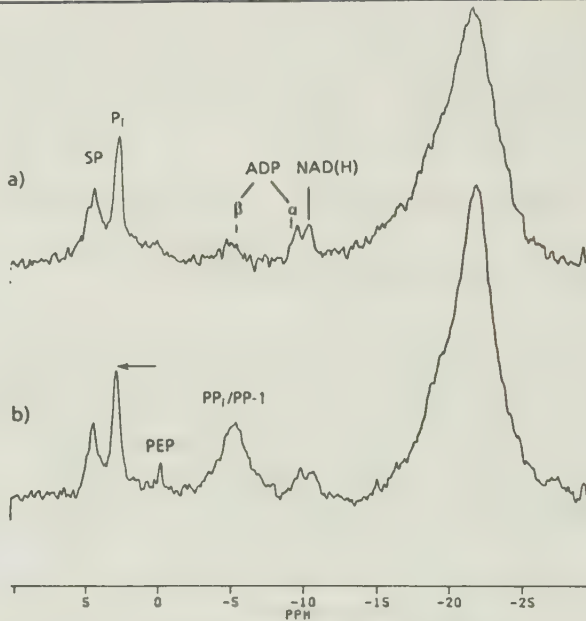


Abbildung 5-16: Spektren anaerober Zellen bei Aufnahme von NH_3

- a) Anaerobe Zellsuspension, $pH_{int} = 7,0$
- b) Zellen nach Zugabe von 10 mmol l^{-1} NH_4Cl zum Medium; pH_{int} ist auf 7,25 gestiegen

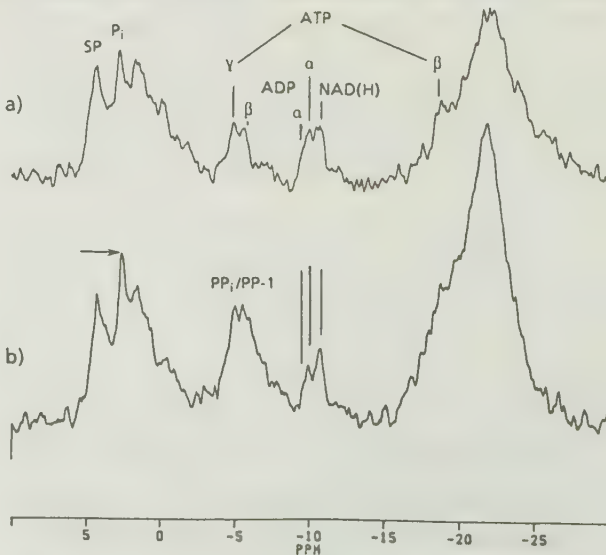


Abbildung 5-17: Spektren belüfteter Zellen bei Aufnahme von NH_3

- a) Aerobe Zellsuspension
- b) Zellen nach Zugabe von 10 mmol l^{-1} NH_4Cl zum Medium; pH_{int} ist um 0,1 gefallen

Abbildung 5-18 zeigt, daß bei einer Variation des pH des Mediums von NH_4Cl pH_{int} im alkalischen Medium konstant gehalten wird. Gegenüber saurem Medium ist die pH-Regelung noch weniger wirksam als bei anaeroben Zellen im Normalmedium.

Die Zugabe von Protonophoren DNP und CCCP zu Zellsuspensionen führt zu einer Entkopplung der Respiration. Der Verbrauch von Luft-sauerstoff nimmt zu (Kirst 1980a), die Phosphorylierung von ADP zu ATP wird unterbunden. Auch bei Begasung einer mit Entkopplern behandelten Zellsuspension mit Luft und Sauerstoff zeigt das Spektrum die Charakteristika von energiearmen Zellen. Die Energieversorgung erfolgt ausschließlich durch Glykolyse.

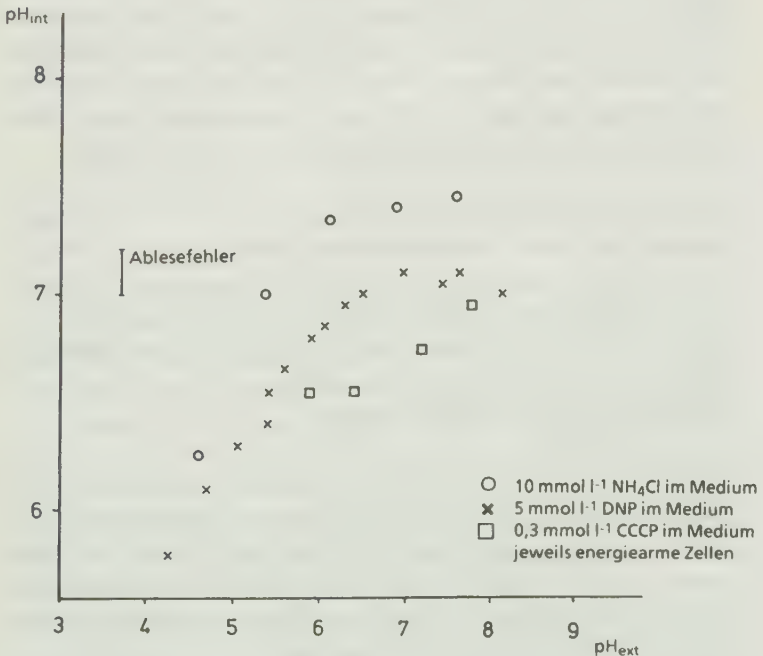


Abbildung 5-18: Der intrazelluläre pH als Funktion des externen pH unter der Wirkung von Entkopplern

In Anwesenheit von DNP findet eine Regelung von pH_{int} unterhalb von pH_{ext} 7 nicht mehr statt. Der interne pH nimmt den Wert von pH_{ext} an (Abb. 5-18). Bei alkalischen pH-Werten im Medium gibt es dagegen keinen Ausgleich der Protonenkonzentrationen über die Plasmamembran: pH_{int} steigt auch bei pH_{ext} 9 nicht über 7,1.

Auch CCCP führt im alkalischen Medium nicht zu einem Konzentrationsausgleich über die Plasmamembran. pH_{int} steigt bis pH_{ext} 9,5 nicht über 7; der intrazelluläre pH liegt vielmehr um 0,2 bis 0,4 unter dem für anaerobe Zellen typischen pH_{int} .

5.6.6. Diskussion: Der Leistungsbedarf der pH-Stabilisierung

5.6.6.1 Einleitung: Die Notwendigkeit von Stabilisierungsmechanismen

Die weitgehende Stabilität des intrazellulären pH bei unterschiedlichen äußeren pH-Werten ist eine Voraussetzung für die Lebensfähigkeit von *Platymonas* in einem Milieu mit veränderlichen Bedingungen. Bei extremen pH-Werten des Mediums treten Protonen- und Hydroxylionenflüsse über die Plasmamembran auf, die das Cytoplasma stark belasten. Eine gezielte Stabilisierung des intrazellulären pH ist daher notwendig.

Aktive, das heißt energieabhängige Mechanismen - zum Beispiel Ionenpumpen - und passive, energieunabhängige Mechanismen - zum Beispiel Puffersysteme - können zur pH-Stabilisierung gleichermaßen beitragen. Die Beteiligung aktiver Prozesse sollte sich in unterschiedlichem Verhalten von pH_{int} bei unterschiedlicher Energieversorgung bemerkbar machen, da diese Prozesse unwirksam werden, wenn ihnen die notwendige Energie nicht mehr zur Verfügung steht.

Die Experimente ergeben, daß pH_{int} in anaeroben Suspensionen bei weniger extremen pH_{ext} instabil wird als in aeroben Suspensionen. Um zu prüfen, ob dies tatsächlich auf unterschiedlichen Leistungen der Zellen beruht, wird der Leistungsbedarf für die pH-Homöostase abgeschätzt und mit dem in Kapitel 5.5.3 ermittelten Leistungsvermögen von *Platymonas* bei Glykolyse und Atmung verglichen.

5.6.6.2 Der Protonen- und Hydroxylionen-Transport durch die Plasmamembran

Unter normalen Bedingungen hält *Platymonas* im sauerstoffversorgten Seewasser von pH 8 eine pH-Differenz von 0,4 über die Plasmamembran aufrecht; der cytoplasmatische pH liegt dann bei 7,6. Nach der Nernst'schen Gleichung gilt für das elektrochemische Potential über die Membran $\Delta\mu_{H^+}$ für Protonen

$$\Delta\mu_{H^+} = RT \ln \frac{C_{H^+}^{ext}}{C_{H^+}^{int}} - F \Delta\Psi = \quad (5.3)$$

$$2,303 RT (pH_{int} - pH_{ext}) - F \Delta\Psi$$

($C_{H^+}^{int}$, $C_{H^+}^{ext}$: intrazelluläre bzw. extrazelluläre Protonenkonzentration; $\Delta\Psi = \Psi_{int} - \Psi_{ext}$: Potentialdifferenz über die Plasmamembran; $\Delta\mu_{H^+}$: elektrochemisches Potential für Protonen, bezogen auf das Medium (Einheit J mol⁻¹)) (Friedman 1986).

Eine Potentialdifferenz $\Delta\Psi$ von -58 mV (d.h. innen negativ) würde gerade einer pH-Differenz von 1 (innen sauer) das Gleichgewicht halten. Die normale pH-Differenz in Seewasser von 0,4 entspricht einem $\Delta\Psi$ von -23 mV.

Pflanzliche Zellen haben Plasmalemmapotentiale zwischen -40 mV und -200 mV (Smith und Raven 1976). Speziell bei marinen Algen, die bei pH 8 leben, sind Potentiale von -170 mV gemessen worden (*Lamprothamnium*: Kirst und Bisson 1982, *Acetabularia*: Goldfarb et al. 1984b). Unabhängig von der Frage, ob diese Potentiale Diffusionspotentiale darstellen oder durch elektrogene Pumpen hervorgerufen werden, ergibt sich, daß bei pH_{ext} 8 und darunterliegenden Werten auf jeden Fall ein elektrochemisches Potential existiert, das Protonen in das Zellinnere zieht und Hydroxylionengruppen aus der Zelle hinaustreibt.

Der Fluß J von Ionen durch eine Membran hindurch ist berechenbar durch Integration der Elektrodifusionsgleichung. Wenn ein konstantes elektrisches Feld im Inneren der Membran angenommen wird und wenn die totale Ionenkonzentration auf beiden Seiten der Membran nahezu gleich ist, läßt sich der Fluß einer Spezies von Ionen durch die Goldman-Gleichung (auch constant field equation) beschreiben:

$$J = -\Pi \frac{z K' \Delta \Psi'}{1 - e^{(z K' \Delta \Psi')}} (C_1 - C_2 e^{(z K' \Delta \Psi')}) \quad (5.4)$$

Dabei ist:

J : Fluß des betrachteten Ions aus Phase 1 in Phase 2 (in $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Π : Membranpermeabilität des Ions (in m s^{-1})

z : Wertigkeit des Ions

C_i : Konzentration des transportierten Ions in Phase i (in mol m^{-3})

$\Delta \Psi'$: Potentialdifferenz $\Psi_2 - \Psi_1$

$K' : F/RT \hat{=} 39,6 \text{ C J}^{-1}$ bei 20°C

(Lakshminarayanaiah 1984).

Die Annahme einer gleichen Gesamtionenkonzentration innerhalb und außerhalb einer Zelle ist in Seewasser zulässig (vergleiche die intrazellulären Ionenkonzentrationen nach Kirst 1977c, Dickson und Kirst 1986; die Gleichheit der Ionenzusammensetzung ist keine Voraussetzung für die Anwendbarkeit von Gleichung (5.4)). Für den Protonenfluß in die Zelle hinein gilt dann

$$J_{\text{H}^+} = -\Pi_{\text{H}^+} \frac{K' \Delta \Psi}{1 - e^{(K' \Delta \Psi)}} 10^3 (10^{-\text{pH}_{\text{ext}}} - 10^{-\text{pH}_{\text{int}} + K'' \Delta \Psi}) \quad (5.5)$$

mit $\Delta \Psi = \Psi_{\text{int}} - \Psi_{\text{ext}} < 0$, $z = +1$, $K'' = (\lg e) \cdot K' = 17,2 \text{ C J}^{-1}$; der Faktor 10^3 folgt aus $[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}} \cdot 10^3 \text{ mol m}^{-3}$.

Der Exponent $\text{pH}_{\text{int}} - K'' \Delta \Psi = \text{pH}_{\text{äqu}}$ gibt den Gleichgewichts-pH an, den pH_{ext} einnehmen muß, wenn der Protonenstrom verschwinden soll. Er liegt wegen der Wirkung von $\Delta \Psi$ über pH_{int} ($\Delta \Psi$ ist stets negativ!). pH_{int} kann auch durch Flüsse von OH^- beeinflusst werden. Für J_{OH^-} aus der Zelle heraus gilt

$$J_{\text{OH}^-} = -\Pi_{\text{OH}^-} \frac{K' \Delta \Psi}{1 - e^{(K' \Delta \Psi)}} \cdot 10^3 (10^{-\text{pOH}_{\text{int}}} - 10^{-\text{pOH}_{\text{ext}} + K'' \Delta \Psi}) \quad (5.6)$$

(Die Vorzeichen der Exponenten $K' \Delta \Psi$ ergeben sich ausgehend von Gleichung (5.4): $z \Delta \Psi' = -1 (\Psi_{\text{ext}} - \Psi_{\text{int}}) = \Delta \Psi < 0$. Mit diesem Vorzeichen gilt in Gleichung (5.5) und (5.6) dann jeweils $1 - e^{K' \Delta \Psi} \approx 1$.)

Daten über das Membranpotential von *Platymonas* liegen nicht vor. Deshalb wird für die folgende Abschätzungen ein mittlerer Wert von $-0,1$ V angenommen. Mit $\text{pH}_{\text{int}} = 7,6$ gilt dann $\text{pH}_{\text{äqu}} = 9,3$. Bei maximaler Polarisation der Membran wird $\Delta\psi$ nicht unter $-0,2$ V liegen ($\text{pH}_{\text{äqu}} \approx 11,0$), bei minimaler Polarisation nicht über -40 mV ($\text{pH}_{\text{äqu}} \approx 8,3$).

Die Permeabilität von Protonen ist für Lipiddoppelschichten gemessen worden (Nichols und Deamer 1980, Gutknecht 1987). Sie ist nicht unabhängig vom pH; zur Abschätzung des passiven Protonenflusses in eine Zelle oder aus ihr heraus wird hier der Wert von 10^{-6} m s^{-1} als untere Grenze angenommen. In natürlichen Membranen sind eher höhere Permeabilitäten zu erwarten (bis $1,3 \cdot 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$; Nichols und Deamer 1980). Außerdem wird angenommen, daß die Permeabilität von OH^- der von H^+ entspricht.

Für $\text{pH}_{\text{int}} = 7,6$, $\Delta\psi = -0,1$ V und $\Pi_{\beta^+} = \Pi_{\text{OH}^-} = 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$ sind Werte für J_{H^+} und J_{OH^-} als Funktion von pH_{ext} in Tabelle 5-5 aufgeführt. J^Z gibt den Protonen- beziehungsweise Hydroxylfluß in mol s^{-1} für eine einzelne Zelle mit einer typischen Oberfläche von $2,80 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2$ an, $J^{\Delta C}$ die daraus folgende Änderung der Konzentration (in $\text{mmol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$), wenn sich die Ionen auf ein osmotisches Volumen von $\sim 160 \cdot 10^{-15} \text{ l}$ pro Zelle verteilen.

J_{H^+} hängt im wesentlichen von pH_{ext} ab, weil $10^{-\text{pH}_{\text{ext}}}$ der Term ist, der die Größe der Differenz in den Klammern von Gleichung (5.5) bestimmt, sobald pH_{ext} um eine Einheit unter $\text{pH}_{\text{äqu}}$ liegt. J_{OH^-} hängt dagegen von pOH_{int} ab und ist daher nahezu konstant. Oberhalb von $\text{pH}_{\text{ext}} 6,4$ wird der Ionenfluß durch J_{OH^-} dominiert, unterhalb $\text{pH}_{\text{ext}} 6,4$ durch J_{H^+} . Bei $\text{pH}_{\text{ext}} 6,2$ erreicht der Protoneneinstrom in die Zelle etwa den Wert der Protonenproduktion durch Glykolyse ($7,6 \cdot 10^{-19} \text{ mol s}^{-1}$). Zwischen pH 6 und 5 hat der Protonenstrom eine Schwelle erreicht, unterhalb der das Cytoplasma auch bei Pufferung mit $\beta = 50 \cdot 10^{-3} \text{ mol H}^+ \text{ l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$ recht schnell! (d.h. bei pH 5 in etwa 10 min) angesäuert werden würde. Tatsächlich knickt die Kurve $\text{pH}_{\text{int}} = f(\text{pH}_{\text{ext}})$ (Abb. 5-12) bei $\text{pH}_{\text{ext}} 5,2$ nach unten ab, bei anaeroben Zellen bereits bei 6,5 ppm. Das spricht dafür, daß Π_{H^+} eher über 10^{-6} m s^{-1} liegt. Die Belastung einer Zelle durch Diffusion von H^+ durch die Plasmamembran kann also im sauren Milieu ein Ausmaß annehmen, das einen wirksamen Mechanismus zur pH-Homöostase notwendig macht.

Tabelle 5-5: Protonen- und Hydroxylionenflüsse über die Plasmamembran

Tabelle 5-5a: Protonenfluß in die Zelle bzw. Hydroxylionenfluß aus der Zelle bei saurer Belastung ($\Delta\Psi = -100$ mV)

pH	pOH	J_{H^+}	J_{OH^-}	$J_{H^+}^2$	$J_{OH^-}^2$	$J_{H^+}^{\Delta c}$	$J_{OH^-}^{\Delta c}$
9	5	$2,0 \cdot 10^{-12}$	$8,4 \cdot 10^{-10}$	$5,7 \cdot 10^{-22}$	$2,4 \cdot 10^{-19}$	$3,3 \cdot 10^{-6}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$
8	6	$3,8 \cdot 10^{-11}$	$1,5 \cdot 10^{-9}$	$1,1 \cdot 10^{-20}$	$4,3 \cdot 10^{-19}$	$6,2 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$
7	7	$4,0 \cdot 10^{-10}$	$1,6 \cdot 10^{-9}$	$1,1 \cdot 10^{-19}$	$4,5 \cdot 10^{-19}$	$6,6 \cdot 10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^{-3}$
6	8	$4,0 \cdot 10^{-9}$	$1,6 \cdot 10^{-9}$	$1,1 \cdot 10^{-18}$	$4,5 \cdot 10^{-19}$	$6,7 \cdot 10^{-3}$	$2,7 \cdot 10^{-3}$
5	9	$4,0 \cdot 10^{-8}$	$1,6 \cdot 10^{-9}$	$1,1 \cdot 10^{-17}$	$4,5 \cdot 10^{-19}$	$6,7 \cdot 10^{-2}$	$2,7 \cdot 10^{-3}$
4	10	$4,0 \cdot 10^{-7}$	$1,6 \cdot 10^{-9}$	$1,1 \cdot 10^{-16}$	$4,5 \cdot 10^{-19}$	$6,7 \cdot 10^{-1}$	$2,7 \cdot 10^{-3}$
3	11	$4,0 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-9}$	$1,1 \cdot 10^{-15}$	$4,5 \cdot 10^{-19}$	6,7	$2,7 \cdot 10^{-3}$
2	12	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-9}$	$1,1 \cdot 10^{-14}$	$4,5 \cdot 10^{-19}$	66,5	$2,7 \cdot 10^{-3}$

Tabelle 5-5b: Protonenfluß aus der Zelle bzw. Hydroxylionenfluß in die Zelle bei alkalischer Belastung ($\Delta\Psi = -100$ mV)

pH	pOH	$J_{H^+}^2$	$J_{OH^-}^2$	$J_{H^+}^{\Delta c}$	$J_{OH^-}^{\Delta c}$	$J_{OH^-}^2 \cdot 1)$	$J_{OH^-}^{\Delta c} \cdot 1)$
13	1	$5,4 \cdot 10^{-22}$	$2,2 \cdot 10^{-15}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$	12,7	$8,9 \cdot 10^{-17}$	0,47
12	2	$5,4 \cdot 10^{-22}$	$2,1 \cdot 10^{-16}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$	1,26	$7,2 \cdot 10^{-18}$	$4,2 \cdot 10^{-2}$
11,5	2,5					$1,7 \cdot 10^{-18}$	$9,8 \cdot 10^{-3}$
11	3	$5,3 \cdot 10^{-22}$	$2,1 \cdot 10^{-17}$	$3,1 \cdot 10^{-6}$	0,124		
10	4	$4,3 \cdot 10^{-22}$	$1,7 \cdot 10^{-18}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	0,01		

1) $\Delta\Psi = -200$ mV; $pH_{\text{äqu}} = 11,05$

Da $\Delta \Psi$ in den Gleichungen (5.5) und (5.6) jeweils in den Exponenten des betragsmäßig kleineren Terms in der Klammer auftritt, hängt der das Cytoplasma ansäuernde Protonenfluß nur linear von $\Delta \Psi$ ab (wegen des Faktors vor der Klammer; der Nenner dieses Faktors liegt nahe bei 1), dagegen exponentiell von pH_{ext} . Änderungen des Membranpotentials können einer Ansäuerung des Cytoplasma bei niedrigem externen pH demnach nicht wesentlich entgegenwirken, solange das Potential nicht sein Vorzeichen wechselt! Auch eine geringfügige Verschiebung von pH_{int} wirkt sich nicht auf J_{H^+} aus, so daß die hier getroffenen Feststellungen für aerobe und anaerobe Zellen ($\text{pH}_{\text{int}} \sim 7,1$) gleichermaßen gelten.

Im alkalischen Medium kehrt sich das Vorzeichen der Flüsse um. Wenn pH_{ext} über $\text{pH}_{\text{äqu}}$ liegt, ist der Protonenfluß aus der Zelle heraus gerichtet, der Hydroxylstrom in die Zelle hinein. Die Goldman-Gleichung wird dann für OH^- zu

$$J_{\text{OH}^-} = +\Pi_{\text{OH}^-} \frac{K' \Delta \Psi}{1 - e^{-(K' \Delta \Psi)}} \cdot 10^3 (10^{-\text{pOH}_{\text{ext}}} - 10^{-\text{pOH}_{\text{int}}} e^{-(K' \Delta \Psi)}) \quad (5.7)$$

Der Exponent $-(K' \Delta \Psi)$ der Exponentialfunktion ist positiv, da $\Delta \Psi < 0$. Für $|\Delta \Psi| > 0,05 \text{ V}$ ist im Unterschied zu den Gleichungen (5.5) und (5.6) $e^{-(K' \Delta \Psi)} \gg 1$, so daß näherungsweise gilt

$$J_{\text{OH}^-} \approx \Pi_{\text{OH}^-} K' \Delta \Psi \cdot 10^3 (10^{-(\text{pOH}_{\text{ext}} + K'' \Delta \Psi)} - 10^{-\text{pOH}_{\text{int}}}) \quad (5.8)$$

Wenn $\text{pH}_{\text{ext}} > \text{pH}_{\text{äqu}}$ gilt ($\text{pOH}_{\text{ext}} - K'' \Delta \Psi < \text{pOH}_{\text{int}}$). Dann ist

$10^{-(\text{pOH}_{\text{ext}} + K'' \Delta \Psi)}$ der dominierende Term in der Klammer. Man erkennt, daß der OH^- -Fluß jetzt - im Gegensatz zu den Verhältnissen bei saurem Milieu - wesentlich von $\Delta \Psi$ abhängt, das jetzt im Exponenten des Terms steht, der die Größe des Flusses bestimmt.

Für den Fluß von Protonen aus der Zelle heraus gilt entsprechend

$$J_{H^+} \approx \Pi_{H^+} K' \Delta \Psi \cdot 10^3 (10^{(-pH_{int} - K''\Delta \Psi)} - 10^{-pH_{ext}}) \quad (5.9)$$

Da pH_{int} konstant gehalten wird, hängt J_{H^+} nur von $\Delta \Psi$ ab. Tabelle 5-5 zeigt aber, daß $|J_{OH^-}|$ stets um Größenordnungen über $|J_{H^+}|$ liegt, so daß pH_{int} auch dann nur vom Hydroxylfluß bestimmt werden würde, wenn Π_{OH^-} um bis zu drei Größenordnungen unter Π_{H^+} läge. Die hohe Hydroxylkonzentration bei den stark alkalischen pH-Werten führt dazu, daß J_{OH^-} schon bei wenig über pH_{aqu} liegenden Werten von pH_{ext} so groß wird, daß das Cytoplasma auch bei Pufferung mit $\beta = 50 \cdot 10^{-3}$ mol $H^+ l^{-1} pH^{-1}$ ohne zusätzliche Regelung schnell alkalisiert werden würde.

5.6.6.3 Die pH-Stabilisierung durch Puffer

Die gemessene Pufferkapazität von $80 \cdot 10^{-3}$ mol $H^+ l^{-1} pH^{-1}$ ist mit Sicherheit als obere Schranke für die unter Normalbedingungen herrschende Pufferkapazität anzusehen. Die Spektren in Abbildung 5-16 zeigen, daß unter der Einwirkung von $10 \text{ mmol } l^{-1} NH_4Cl$ im Medium ungefähr $20 \text{ mmol } l^{-1}$ Phosphatreste als Pyrophosphat auftauchen. Im pH-Bereich um 7 ist die Pufferkapazität von terminalen Phosphaten kleiner als die von freiem Phosphat, da Pyrophosphat und Polyphosphate weitgehend mit zweiwertigen Ionen komplexiert sind, wie aus ihrer chemischen Verschiebung erkennbar ist. Der pK_a von Mg^{2+} -komplexierten terminalen Phosphaten liegt unter 6. Im Cytoplasma ohne alkalische Belastung muß der Anteil des Pyrophosphates von der gemessenen Pufferkapazität abgezogen werden. Die Annahme einer Kapazität von $50 \text{ mmol } H^+ l^{-1} pH^{-1}$ ist auch angesichts einer Reihe von anderweitig gemessenen Daten plausibel. Ein derartiger Puffer kann kleineren Ionenflüssen entgegenwirken. *Platymonas* kann ungünstigen Bedingungen im Verlauf der Tide aber während der Dauer von Stunden ausgesetzt sein. Daher ist es willkürlich, aber plausibel, die Wirksamkeit eines Puffers an der Forderung zu messen, daß sich innerhalb eines Zeitraumes von einer Stunde der pH um nicht mehr als eine Einheit ändern darf. Die Grenze, jenseits der das Puffersystem zur pH-Homöostase nicht mehr ausreicht, liegt dann bei $J^{\Delta C} \approx 1,4 \cdot 10^{-2} \text{ mmol } H^+ l^{-1} s^{-1}$. Sie ist bei

pH_{ext} 6,2 im sauren Milieu erreicht. Im alkalischen Milieu ist sie abhängig von $\Delta\psi$ und liegt etwas weniger als eine Einheit über $\text{pH}_{\text{äqu}}$.

Die hier beschriebene Pufferwirkung kann außer auf Säure-Base-Gleichgewichten auch auf Prozessen des Metabolismus beruhen. Ein möglicher "metabolischer Puffer" ist das PEP-Carboxylase/Malat-Dehydrogenasesystem, das als pH-Regulator in höheren Pflanzen vermutet wird (Davies 1973). Die Existenz eines solchen Systems kann durch die Bestimmung der Pufferkapazität mit der beschriebenen Methode allein nicht nachgewiesen werden. Das Hervortreten eines deutlichen Signals bei der chemischen Verschiebung von PEP in alkalisch belasteten Zellen ist ein Hinweis auf eine Reaktion des Stoffwechsels: PEP kann als Vorstufe bei der Produktion organischer Säuren dienen. Die Funktion dieses Systems setzt allerdings voraus, daß bei alkalischer Belastung ausreichend NAD^+ und bei saurer Belastung NADH beziehungsweise NADPH zur Verfügung stehen.

5.6.6.4 Der Leistungsbedarf von Pumpsystemen

Neben Puffermechanismen dürfte der aktive H^+ - oder OH^- -Transport in die Zelle oder aus der Zelle heraus die wesentliche Rolle bei der Regulierung des intrazellulären pH spielen. In Süßwasseralgen steht der Protonenexport darüberhinaus im Zusammenhang mit weiteren aktiven Transportprozessen; in marinen Algen wird - wegen des unter Normalbedingungen im Seewasser geringeren pH-Gefälles und des deshalb geringeren $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ - dieser Transport möglicherweise ersetzt durch Prozesse, die mit Na^+ -Export gekoppelt sind (Raven und Smith 1980). Protonenpumpen sind daher möglicherweise weniger leistungsstark. Die geringere Effizienz der pH-Regelung bei anaeroben Zellen zwischen pH_{ext} 4 und 7 kann aber nicht durch einen Mangel an Protonenpumpen verursacht sein, denn bei aeroben Zellen wird pH_{int} auf seinem Normalwert gehalten.

In den unterschiedlichen Antworten des pH_{int} auf extreme pH_{ext} bei aeroben und anaeroben Suspensionen spiegeln sich wahrscheinlich unterschiedliche verfügbare Leistungen der Zellen wider. Während aerobe Zellen ausreichende Leistungsreserven besitzen, um pH_{int} auch bei pH_{ext} , die weit von Normalwerten abweichen, durch energiezehrende Mechanismen nahezu konstant zu halten, geraten anaerobe Zellen an die Grenzen ihrer Leistung. Bei *Platymonas* ist die pH-Regelung vermutlich

aus diesem Grund im Säuren weniger effizient, während der Stoffwechsel im Alkalischen mit zusätzlichen Reaktionen wie der polyP-Hydrolyse antwortet.

Der Leistungsbedarf eines Pumpmechanismus läßt sich anhand der bereits abgeschätzten Ionenflüsse ebenfalls berechnen. Der Energieaufwand, der nötig ist, um Protonen (oder Hydroxylionen) gegen ein elektrochemisches Potential $\Delta\mu$ über eine Membran zu pumpen, ist mindestens so groß wie die Energie, die die Ionen dissipieren, wenn sie gegen den Potentialgradienten durch die Membran diffundieren. Diese Energie muß mindestens aufgewendet werden, wenn der pH_{int} dadurch stabilisiert wird, daß die Ionenpumprate einen passiven Ionenfluß J gerade kompensiert.

Die aufzubringende Leistung $P_{\text{H}^+/\text{OH}^-}$ in Watt pro Zelle ist

$$P_{\text{H}^+/\text{OH}^-} = J_{\text{H}^+/\text{OH}^-}^Z \Delta\mu \quad . \quad (5.10)$$

($\Delta\mu$ wird auch für OH^- durch Gleichung (5.3) gegeben, da der Transport eines Protons dem entgegengerichteten Transport eines Hydroxylions äquivalent ist.)

Tatsächlich ist der Leistungsbedarf höher, da der Pumpmechanismus nicht verlustfrei arbeiten kann.

In Abbildung 5-19 ist der Leistungsbedarf für Protonenexport/Hydroxylionenimport im Säuren und Hydroxylionenexport/Protonenimport im Alkalischen als Funktion von pH_{ext} für verschiedene $\Delta\Psi$ dargestellt. Der Schnittpunkt der erforderlichen Pumpleistung mit der bei Glykolyse verfügbaren Leistung ($5 \cdot 10^{-14}$ W) liegt im Säuren zwischen pH_{ext} 5 und 6, der Schnittpunkt mit der bei Atmung verfügbaren Leistung ($\sim 10^{-12}$ W) liegt zwischen pH_{ext} 4 und 5, also etwa eine Einheit niedriger. Dies korrespondiert mit dem Endpunkt einer wirksamen pH-Regelung bei pH_{ext} 5 im aeroben und etwa eine Einheit darüber im anaeroben Zustand. Zu beachten ist, daß die Lage der Schnittpunkte durch ein veränderliches $\Delta\Psi$ zwischen -40 mV und -200 mV nur um etwa eine Einheit verschoben wird. Anzunehmen ist, daß die Membran im Säuren eher depolarisiert als hyperpolarisiert ist, so daß $\Delta\Psi$ bei -40 mV liegt. Der tatsächliche Leistungsbedarf liegt etwas über dem durch die Kurve für

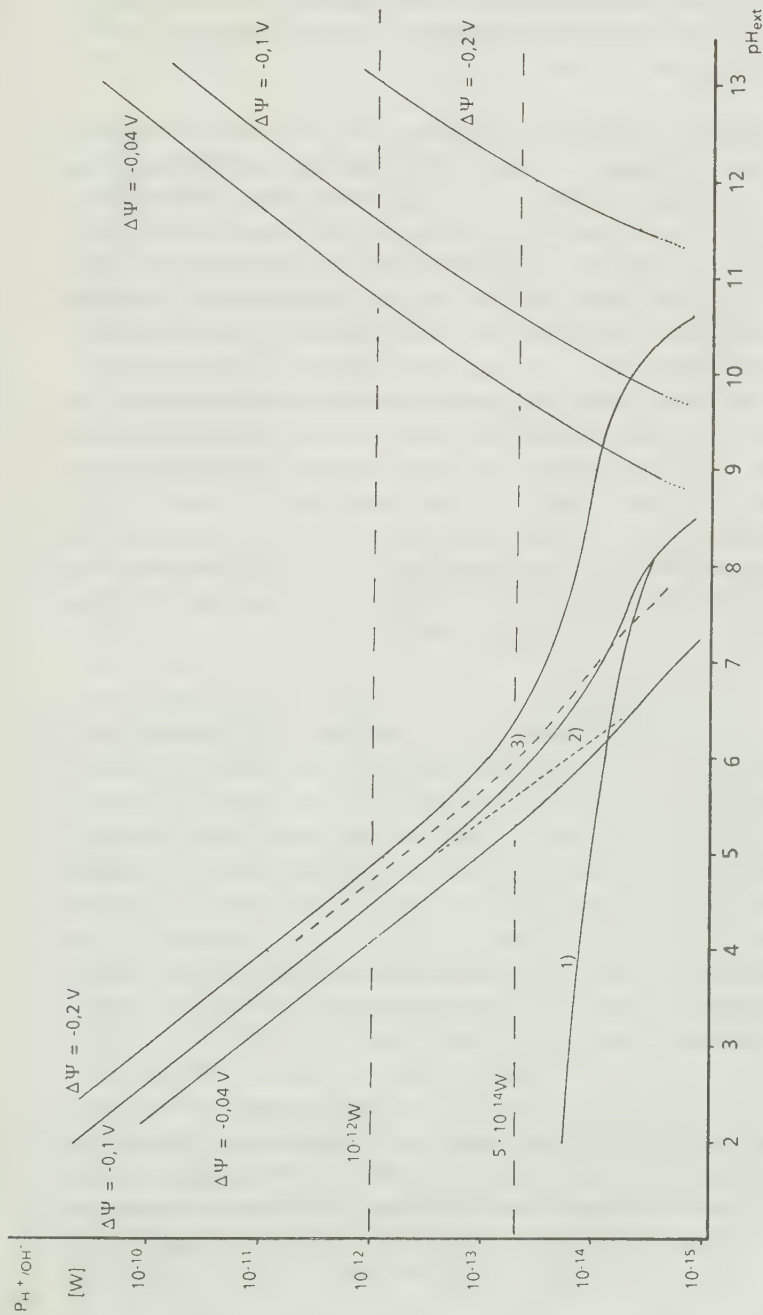


Abbildung 5-19: Protonen- bzw. Hydroxylionenpumpleistung als Funktion des externen pH

Dargestellt ist die Summe der für OH^- - und H^+ -Transport notwendigen Leistungen, sowie 1) P_{OH^-} bei saurem pH für $\Delta\Psi = -0,1 \text{ V}$ und 2) P_{H^+} bei saurem pH für $\Delta\Psi = -0,1 \text{ V}$. 3) (gestrichelt): Aufzubringende Gesamtleistung bei einem Wirkungsgrad der Pumpe von 0,5.

$\Delta\Psi = -40$ mV angegebenen, da Leistungsverluste zu erwarten sind (die gestrichelte Kurve in Abb. 5-19 gibt den Leistungsbedarf bei einem Wirkungsgrad von 50 % an).

Während Depolarisation im sauren Milieu die Ansäuerung des Cytoplasmas beziehungsweise die zur pH-Homöostase notwendige Pumpleistung nur wenig beeinflussen kann, kann Hyperpolarisation im Alkalischen die pH-Regulation wirkungsvoll unterstützen. Die Polarisierung der Membran von -40 mV auf -200 mV verschiebt die Schnittpunkte von erforderlicher Pumpleistung mit bei Glykolyse oder bei Atmung verfügbarer Leistung um $2\frac{1}{4}$ Einheiten zu alkalischerem pH_{ext} . Angesichts ermittelter Werte von -170 mV für $\Delta\Psi$ bei marinen Algen erscheint $\Delta\Psi = -200$ mV für *Platymonas* im alkalischen Milieu nicht unplausibel. Die erforderliche Pumpleistung würde bei Glykolyse die verfügbare Leistung bei $\text{pH}_{\text{ext}} 12,1$ übersteigen, bei Atmung erst bei $\text{pH}_{\text{ext}} 13,1$. Dies korrespondiert überraschend gut mit dem beobachteten Verhalten von pH_{int} : während pH_{int} in aeroben Zellen auch bei $\text{pH}_{\text{ext}} 12,4$ noch stabil war, zeigten anaerobe Zellen oberhalb $\text{pH}_{\text{ext}} 11$ durch polyP-Hydrolyse und Alkalisierung des Cytoplasmas (relativ zum für anaerobe Zellen typischen Wert) eine mangelhafte pH-Regelung an.

Die qualitative Übereinstimmung von $\text{pH}_{\text{int}} = f(\text{pH}_{\text{ext}})$ (Abb. 5-12) mit $\text{P}_{\text{H}^+/\text{OH}^-} = f(\text{pH}_{\text{ext}})$ (Abb. 5-19) darf allerdings nicht überinterpretiert werden. Zum einen kann die Effektivität von Atmung und Glykolyse durch die - wenn auch geringen - Änderungen von pH_{int} mit pH_{ext} abhängen. Die Atmungsrate verdoppelt sich zum Beispiel bei einer Erhöhung von pH_{ext} von 5 auf 10 (Kirst 1980a). Dann wäre die verfügbare Leistung eine Funktion von pH_{ext} . Zum anderen kann auch der Wirkungsgrad von Ionenpumpen von pH_{int} und pH_{ext} abhängen. Die Möglichkeit, daß sich auch die Membranpermeabilitäten mit pH_{ext} ändern, ist bereits erwähnt worden. Diese Abhängigkeiten bestimmen den genauen Verlauf von pH_{int} als Funktion von pH_{ext} .

Bei der Ermittlung der Pumpleistungen bei verschiedenen $\Delta\Psi$ ist außerdem die zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials erforderliche Leistung nicht berücksichtigt worden. Zu einem Teil stellt das Potential ein Diffusionspotential dar. Sein Beitrag dürfte etwa dem Betrag des minimalen Potentials von ~ 40 mV entsprechen. Stärker negative Poten-

tiale können durch elektrogene Pumpen hervorgerufen werden (Serrano 1984), die Kationen aus der Zelle heraus- oder Anionen in sie hinein-pumpen.

Dies ändert allerdings nichts an der qualitativen Aussage, daß das Leistungsvermögen einer Zelle die Grenzen externer pH-Werte bestimmt, außerhalb derer eine Regelung des intrazellulären pH mit Mechanismen, die ihre Energie aus dem üblichen phosphorylierungsabhängigen Energie-stoffwechsel beziehen, nicht mehr möglich ist. Unter Photosynthesebe-dingungen ist die Rate, mit der ATP erzeugt wird, noch weitaus höher als bei Atmung; der Zelle steht auch zur Abwehr von Streßsituationen eine höhere Leistung zur Verfügung - auch *Platymonas* könnten noch niedrigeren pH-Werten widerstehen (wenn die Wachstumsleistung von $4 \cdot 10^{-11}$ W eingesetzt wird, kann pH_{int} theoretisch bis $\text{pH}_{\text{ext}} 2,5$ stabil gehalten werden).

Allerdings kann dann ein entsprechend geringerer Teil der Photosynthe-seleistung für Wachstumsprozesse eingesetzt werden, so daß bei länge-rem Andauern extremer pH-Verhältnisse das Wachstum der Zellen be-einträchtigt wird. Schon der längerfristige Verbrauch eines nennenswer-ten Anteils der bei Atmung verfügbaren Leistung für die pH-Stabilisie-rung kann die Zellen beeinträchtigen. Vermutlich ist das ein Grund für die Ausbildung von Dauerstadien in Form von Zysten, die bei *Platymo-nas* sp. beobachtet wurde, wenn die Alge längere Zeit pH-Werten von 6,0 oder 9,5 ausgesetzt war (Tanoue und Aruga 1975). Auch die aktive Aufnahme von P_i im Licht ist bei alkalischem und bei saurem pH_{ext} (d.h. pH_{ext} 9 bzw. 5) stark verringert (auf die Hälfte bzw. 2/3) (Kirst 1980a).

Eine obligatorische Kopplung des Protonenexports (oder Hydroxylionen-imports) im sauren Milieu an einen passiven Fluß von Na^+ aus dem Me-dium in die Zelle kann ausgeschlossen werden, da ein Austausch des Seewassermediums gegen ein isotones Medium mit Sorbit keine Ände-rung des Regelungsverhaltens von pH_{int} nach sich zieht (Abb. 5-13). Der beobachtete Verlust von P_i an das Medium bei saurem pH kann dagegen darauf hindeuten, daß der Protonenexport mit dem gleichzeitigen Export von Anionen verbunden ist, um einen Ladungsausgleich herbeizuführen. Bei Anwesenheit von NaCl im Medium könnte dies durch einen (aktiven) Export von in die Zelle diffundiertem Cl^- erfolgen.

In der Wirkung der Protonophore auf pH_{int} spiegelt sich wider, daß sie einen pH-Ausgleich durch den Transport von Protonen, aber nicht von Hydroxylionen, vermitteln. Im sauren Medium wird ein so hoher Protonenfluß in die Zelle erzeugt, daß die Glykolyseleistung (die wegen der entkoppelnden Wirkung der Protonophore ausschließlich zu Verfügung steht) nicht ausreicht, um eine pH-Differenz über die Membran aufrecht zu erhalten. Oberhalb von $\text{pH}_{\text{ext}} 7$ kann ein pH-Ausgleich nur durch einen Protonenexport aus der Zelle erfolgen. Der Protonenfluß über die Membran wird daher von der Protonenkonzentration im Cytoplasma bestimmt und ist von pH_{ext} unabhängig. Offenbar kann pH_{int} gegen einen protonophorvermittelten Protonenexport bei einem $\text{pH}_{\text{int}} 7$ stabil gehalten werden.

5.6.6.5 Die Steuerung der pH-Stabilisierung: Eine offene Frage

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur pH-Regulation werfen eine Frage auf, die angesichts des Verhaltens des Stoffwechsels unter alkalischer Belastung besonders deutlich wird, die Frage nach der Steuerung der pH-Homöostase. Offenbar wird polyP teilweise hydrolysiert, wenn die notwendige Pumpleistung die verfügbare Leistung übersteigt, was unter Glykolysebedingungen zwischen $\text{pH}_{\text{ext}} 11$ und 12 eintritt.

Die Hydrolyse des polyP kann einerseits zur Bereitstellung zusätzlicher Pufferkapazität erfolgen, andererseits ist auch denkbar, daß die freiwerdende Energie dem Pumpsystem zugeführt wird. In Abbildung 5-15 wird gezeigt, daß das vorhandene polyP bei $\text{pH}_{\text{ext}} 13$ nach etwa 20 Minuten vollständig hydrolysiert ist. Die in etwa 90 mmol l^{-1} polyP-gebundenen Phosphatresten gespeicherte Bindungsenergie von circa $18 \cdot 10^{-10} \text{ J}$ pro Zelle könnte den Differenzbetrag zwischen Glykolyseleistung und der zu pH_{int} -Stabilisierung bei $\text{pH}_{\text{ext}} 13$ nach Abbildung 5-19 etwa ausreichenden Atmungsleistung von $9,5 \cdot 10^{-13} \text{ W}$ für rund 30 Minuten decken; wenn polyP nicht zu P_i , sondern zu PP_i hydrolysiert wird, wie in Abbildung 5-15 zu erkennen, ist der Zeitraum halb so lang.

Es stellt sich aber die Frage, weshalb die polyP-Hydrolyse induziert wird, während pH_{int} noch deutlich unter Werten liegt, die in atmenden Zellen schon unter Normalbedingungen auftreten. Die offenbar zusätzliche pH-Stabilisierung kann nicht dadurch ausgelöst worden sein, daß pH_{int} eine vorgegebene feste Schranke überschritten hat. Grundsätzlich

scheinen die Pumpmechanismen nicht so gesteuert zu werden, daß sie einen speziellen intrazellulären pH konstant halten, sonst wäre die Konstanz der pH-Differenz zwischen atmenden und glykolysierenden Zellen über den weiten Bereich externer pH-Werte mit den damit verbundenen unterschiedlichen Ionenflußraten nicht erklärbar. Die Ionenpumprate muß entweder gesteuert werden durch eine Größe, die von pH_{int} und vom Stoffwechselzustand der Zelle abhängt, oder der Pumpmechanismus selbst hängt von pH_{int} und einer weiteren stoffwechselabhängigen Größe ab; denkbar wäre eine Abhängigkeit von Γ , aber auch andere Signalgeber sind möglich.

6. Untersuchungen zur Lokalisation und Struktur von Polyphosphat in *Platymonas*

6.1 Einleitung: Ergebnisse von biochemischen und NMR-spektroskopischen Untersuchungen an polyP in Mikroorganismen

Das Signal mit der größten Intensität in den ^{31}P -in vivo-Spektren von *Platymonas* ist das des Polyphosphates. Wie in *Platymonas* ist polyP auch in vielen anderen Mikroorganismen nachgewiesen worden. Untersuchungen mit ^{31}P -NMR sind vor allem an Hefen (Navon et al. 1979, Ostrovskii et al. 1980, Tijssen und van Steveninck 1984, Dawson und MacDonald 1987) und Bakterien (Rao et al. 1985, Kjeldstad und Johnsson 1986) durchgeführt worden. *Chlorella* (Sianoudis et al. 1986a, Küsel 1987) und *Heterosigma akashiwo* (Watanabe et al. 1987) sind die einzigen Algen, an denen polyP gezielt mit ^{31}P -NMR untersucht wurde. Sowohl die Funktion von polyP im Stoffwechsel als auch seine genaue Lokalisation im Organismus sind nicht endgültig geklärt. Es scheint aber spezifisch für Mikroorganismen zu sein.

Ältere Forschungen an polyP beruhen auf Extraktion von zellulären Phosphaten in einer Folge unterschiedlicher Extraktionsschritte, deren Spezifität für polyP aber nicht gesichert ist, und die bei unterschiedlichen Organismen zu verschiedenen Aussagen führen können (Kuhl 1974, Harold 1966). Versuche, eine Beziehung von Ergebnissen stufenweiser Extraktionen mit Ergebnissen der ^{31}P -Spektroskopie herzustellen, sind unternommen worden, insbesondere bezüglich der vermuteten Längen der polyP-Ketten (Rao et al. 1985 für *E. coli*). Eine Verallgemeinerung der Daten auf andere Organismen ist angesichts der unterschiedlichen Wirkungsweisen der in verschiedenen Spezies vorhandenen Polyphosphatasen nicht möglich. Hinzu kommt, daß das Verhältnis von im Spektrum sichtbarem polyP zu immobilem, unsichtbarem polyP nicht bekannt ist. Deshalb ist auch bei der Verwendung der ^{31}P -NMR-Spektroskopie die Untersuchung von Extrakten oder speziell behandelter Zellen notwendig (Küsel 1987, Watanabe et al. 1987), wenn zum Beispiel nach der Menge intrazellulären polyP gefragt wird.

Erstmals berichtete Liebermann (1888) über die Isolierung von Polyphosphat (von ihm Metaphosphorsäure genannt) aus einem Mikroorganismus, nämlich Hefe. Erst seit einer erneuten Isolation von polyP durch Wiame

(1948) wird die Rolle von polyP in Organismen kontinuierlich untersucht (Harold 1966). Schwerpunkte der seitherigen Forschungen einschließlich der neueren ^{31}P -NMR-Arbeiten sind die Fragen nach der Rolle von polyP als Energie- und/oder Phosphatspeicher und nach seiner Lokalisation und Struktur in der Zelle.

Über den polyP-Gehalt von Zellen in Abhängigkeit von Nährstoffversorgung und Energieversorgung sowie in Abhängigkeit vom Lebenszyklus existieren eine Vielzahl von Untersuchungen. In Algen, die mit ^{31}P -NMR untersucht wurden, ist die Menge des polyP vom Phosphatangebot des Mediums abhängig (Cosmarium sp.: Elgavish et al. 1980; Heterosigma: Watanabe et al. 1987; Chlorella: Küsel 1987).

Untersuchungen der Lokalisation von polyP ergaben, daß in verschiedenen Organismen (darunter Chlorella) polyP als färbbare, elektronenmikroskopisch sichtbare Partikel (Granula) vorliegen, die auch in der Vakuole gefunden werden (Kulaev und Vagabov 1983). Mit ^{31}P -NMR ist gezeigt worden, daß sichtbares polyP außerhalb der Zellmembran, möglicherweise im periplasmatischen Raum, vorliegt. Eingriffe in das Medium führten bei Chlorella fusca (Sianoudis et al. 1986a: Alkalisierung des Mediums), Saccharomyces fragilis (Tijssen und van Steveninck 1984: Zufügung von Eu^{3+} zum Medium) und Mycobacterium smegmatis (Ostrovskii et al. 1980: Zufügung von EDTA zum Medium) zu spezifischen Symptomen der polyP-Signale, die zeigen, daß polyP dem externen Medium zugänglich ist. Andere Zellen (z.B. Endomyces magnussii, Ostrovskii et al. 1980) reagieren so, daß die Existenz extrazellulären polyP unwahrscheinlich ist.

In diesem Kapitel wird gezeigt, daß periplasmatisches polyP bei *Platymonas subcordiformis* nicht vorliegt. Die Existenz von intrazellulären und extrazellulären Polyphosphatasen wird belegt. Darüberhinaus werden Spektren von Extrakten und kommerziell erhältlicher polyP untersucht, um Hinweise auf die mögliche Struktur von polyP im Zellinneren zu erhalten.

6.2 Untersuchungen zur Lokalisation von polyP und zur Wirkung von Polyphosphatasen

Außerhalb der Plasmamembran befindet sich kein polyP in meßbarer Menge. Das folgt aus den negativen Ergebnissen der Experimente, mit

denen an *Chlorella*, *Saccharomyces fragilis* und *Mycobacterium smegmatis* periplasmatisches polyP festgestellt wurde:

1. Bei *Chlorella fusca* führte die Alkalisierung des Mediums auf pH 12 zu einer Verschmälerung des polyP-Signals und seiner Verschiebung von -22,5 ppm auf -21 ppm. Verursacht wird dies dadurch, daß Mg^{2+} bei dem hohen pH als $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ausfällt und nicht mehr an polyP bindet, so daß im Spektrum das Signal von unkomplexiertem polyP erscheint. (Es existiert daneben noch polyP, das dem alkalischen Medium nicht zugänglich ist; es befindet sich innerhalb der Plasmamembran.) Bei *Platymonas* ist kein solches verschmälertes und verschobenes Signal erkennbar (Abb. 5-15). Stattdessen wird - in anaeroben Zellen - polyP intrazellulär hydrolysiert. In aeroben Zellen wird das polyP-Signal überhaupt nicht beeinflusst.
2. Bei *Saccharomyces* komplexierte das paramagnetische Lanthanidenion Eu^{3+} außerhalb der Plasmamembran befindliches polyP, wodurch dessen Signal verschwindet. Bei *Platymonas* wäre dasselbe bei der Komplexierung von Dy^{3+} an vorhandenes extrazelluläres polyP zu erwarten. Bei der Verwendung von Dy^{3+} -haltigen Verschiebungsreagenzien ist eine Verschiebung des polyP-Signals auch dann nicht feststellbar, wenn durch die Hydrolyse des Komplexbildners Tripolyphosphat größere Mengen freien Dy^{3+} im Medium vorhanden sind. - Aus der Konstanz des polyP-Signals folgt darüberhinaus, daß Dy^{3+} auch nicht in meßbarer Menge in das Zellinnere gelangt ist (siehe Kap. 7.4.1 und 7.5).
3. Bei *Mycobacterium smegmatis* und bei *Chlorella fusca* führte die Zugabe von EDTA zum Medium ähnlich wie die Alkalisierung zu einer Entfernung von Me^{2+} von den polyP-Ketten und deshalb zur Ausbildung eines Signals von Na-polyP bei -21 ppm. Bei *Platymonas* erscheint zwar ein scharfes Signal bei -20,8 ppm im Spektrum nach Zugabe von 100 mmol l^{-1} EDTA zum Medium. Es sitzt auf dem nicht wesentlich veränderten breiten Signal intrazellulären polyP und stammt von freiem polyP im Medium, wie die Überprüfung des abzentrifugierten Mediums zeigt. Das zugefügte EDTA hat vermutlich die Zellmembran durchlässig gemacht (durch Komplexierung der Ca^{2+} -Ionen, die die Membran stabilisieren), so daß polyP und P_i aus dem Zellinneren in das Medium gelangten.

Die Instabilität extrazellulärer Polyphosphate in Zellsuspensionen spricht ebenfalls dagegen, daß polyP außerhalb der Zellmembran deponiert wird. Die Hydrolyse von Tripolyphosphat (TP_i), das sich im Medium von Zellsuspensionen befindet, ist in Abbildung 6-1 dargestellt.

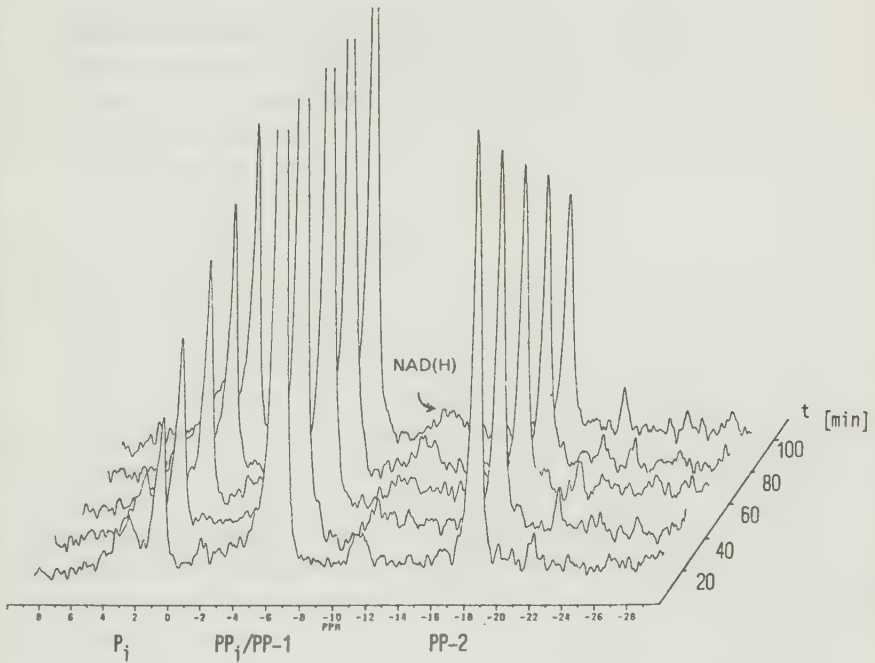


Abbildung 6-1: Zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von TP_i im Medium in Anwesenheit von Zellen

(Anfangskonzentration von TP_i im Medium: 4 mmol l^{-1} Probenvolumen; anaerobe Zellen, PCV 18,1 %; der Beitrag intrazellulären Phosphats zu den Spektren ist am markierten NAD-Signal abzuschätzen; Vergleiche das Spektrum Abbildung 6-2a), das die Zellen nach Austausch des Mediums zeigt.

Den Suspensionen wurden 4 mmol l^{-1} (Probenvolumen) TP_i zugefügt. Dies ist zwar ein unphysiologisch hoher Wert und eine Beeinträchtigung der Zellen durch die hohe Affinität des TP_i zum Beispiel zu Ca^{2+} -Ionen in der Zellmembran kann nicht ausgeschlossen werden; festzustellen

bleibt aber, daß der Verbrauch des TP_i in recht kurzen Zeiträumen stattfindet. Anaerobe Zellen zerlegen TP_i in P_i und PP_i , und zwar war nach etwa 100 bis 120 min bei pH_{ext} 6,8 und einem Zellpartialvolumen von 14,5 % die Hälfte des TP_i hydrolysiert. Aerobe Zellen bauen TP_i in kürzerer Zeit ab. Die halbe TP_i -Menge war nach etwa 40 min bei pH_{ext} 6,8 und 17 % Zellpartialvolumen verbraucht. - Die Hydrolyse deutet auf eine extrazellulär wirkende Polyphosphatase hin.

Nach Entfernen des TP_i -haltigen Mediums (und Waschen der Zellen mit einer NaCl-Lösung) zeigte sich, daß die Zellen PP_i aufgenommen hatten (Abb. 6-2a); auch im Medium war PP_i verblieben.

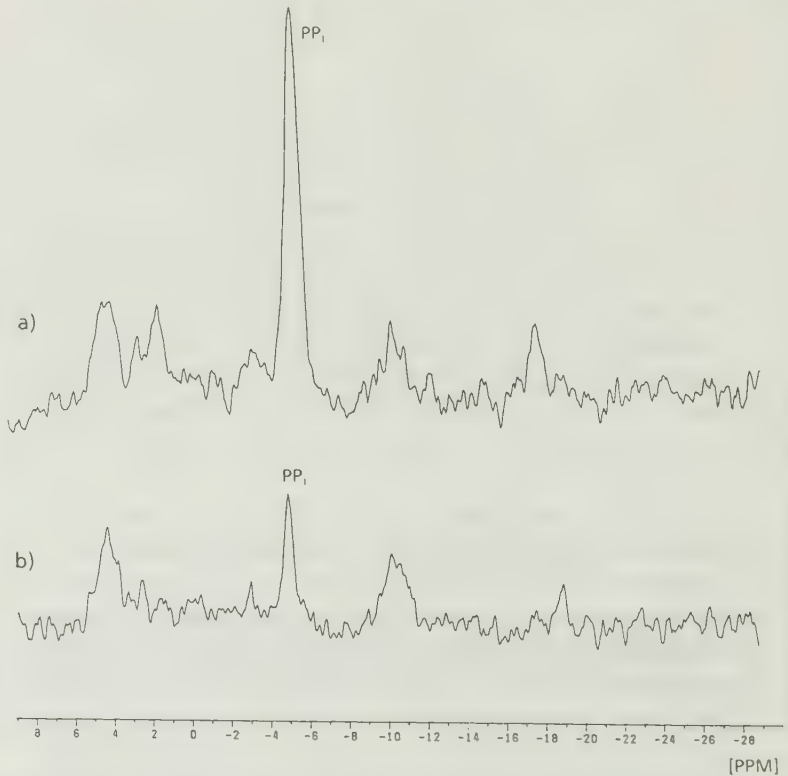


Abbildung 6-2: Zellen nach 120 min in TP_i -haltigem anaeroben Medium

a) Zellen nach Waschen und Resuspendieren in Normalmedium: PP_i ist aufgenommen worden. b) Dieselben Zellen nach 60 min Begasung mit Luft; PP_i ist abgebaut worden.

Wenn die Zellen mit Luft versorgt werden, wird das PP_i abgebaut (Abb. 6-2b). Dies ähnelt übrigens der Situation nach weitgehender Hydrolyse intrazellulären polyP bei alkalischem Streß: auch die Zellen in Abbildung 5-15c enthalten viel PP_i . Unter aeroben Bedingungen wird auch bei diesen Zellen PP_i abgebaut (Abb. 5-15d).

Das Verhalten der Signale von polyP und PP_i , wie es hier und in Kapitel 5.6.4 beschrieben ist, legt die Deutung nahe, daß im Zellinneren offenbar Polyphosphatasen existieren, die im alkalisierten Cytoplasma anaerober Zellen wirken und polyP zu PP_i abbauen. In aeroben Zellen ist die Wirkung eines PP_i -verbrauchenden Mechanismus erkennbar.

6.3. Untersuchungen zur Struktur von zellulärem polyP

6.3.1 Untersuchungen an Zellextrakten

Konzentrationsuntersuchungen am gesamten intrazellulären polyP durch Sichtbarmachen immobilisierter Anteile, indem das Medium alkalisiert wird, wie dies beispielsweise bei *Chlorella* durchgeführt worden ist (Küsel 1987), sind wegen der im Alkalischen wirkenden Polyphosphatasen bei *Platymonas* nicht möglich. Auch Spektren von TCA- und PCA-Extrakten sind mit Vorsicht zu interpretieren. PCA-Extrakte von *Platymonas* enthielten kein polyP, wenn der Extrakt vorsichtig titriert wurde, so daß auch ein vorübergehend oder lokal alkalischer pH vor der Trennung von Überstand und Pellet vermieden wird. Abbildung 5-4b zeigt einen polyP-freien PCA-Extrakt; in Abbildung 5-5b ist dagegen die niederfrequente Seite eines Extraktes zu sehen, der vor der Zentrifugation zeitweilig pH 9 ausgesetzt war. Zeitweilig alkalischer pH löst offenbar polyP aus dem Pellet. Alkalische Extraktion des Pellets, das nach PCA-Extraktion übrigbleibt, mobilisiert weitere polyP-Anteile, und zwar sowohl bei Extraktion in Wasser bei pH 9 - 10 (eingestellt mit NaOH oder KOH) über 10 min (Abb. 6-3a) als auch bei weiterer Extraktion des Pellets dieser Fraktion in konzentrierter KOH über einen Zeitraum von 12 h (Abb. 6-3b). Diese Fraktionierung entspricht im wesentlichen traditionellen Schemata zur polyP-Untersuchung an Mikroorganismen (Harold 1966). Teilweise wird die Verwendung von TCA anstelle von PCA vorgeschlagen. Bei Extraktion von *Platymonas* mit TCA wurde polyP schon in der sauren Fraktion gelöst (Abb. 5-11), in nachgeschalteten alkalischen Extrakten war kein polyP mehr enthalten.

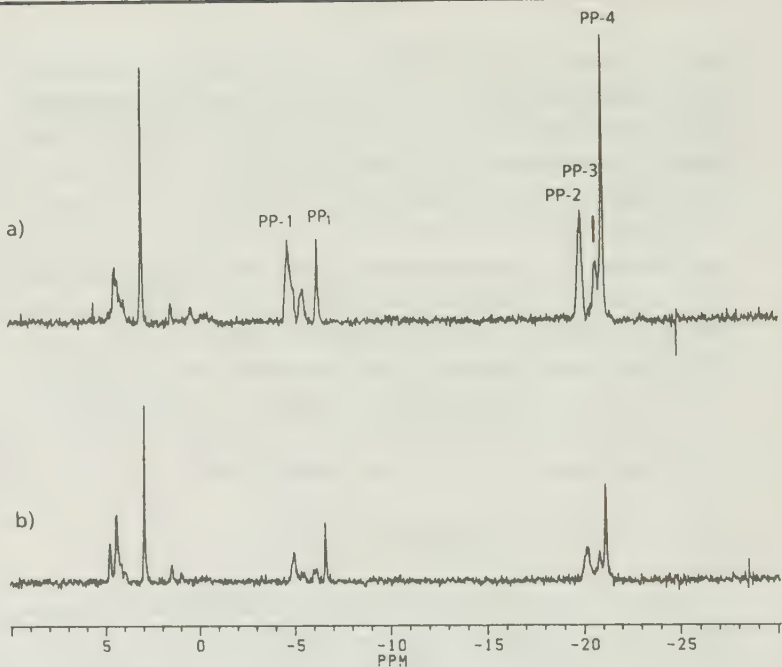


Abbildung 6-3: Alkalische Extrakte von *Platymonas*

a) Ergebnis der alkalischen Extraktion eines Pellets nach PCA-Extraktion bei pH 9 (10 min); Überstand eingestellt auf pH 8, Me_2^{2+} gebunden durch 10 mmol l^{-1} EDTA. b) Ergebnis einer alkalischen Extraktion des Pellets von a) in konzentrierter KOH (10 h); Überstand eingestellt auf pH 8, Me_2^{2+} gebunden durch 10 mmol l^{-1} EDTA

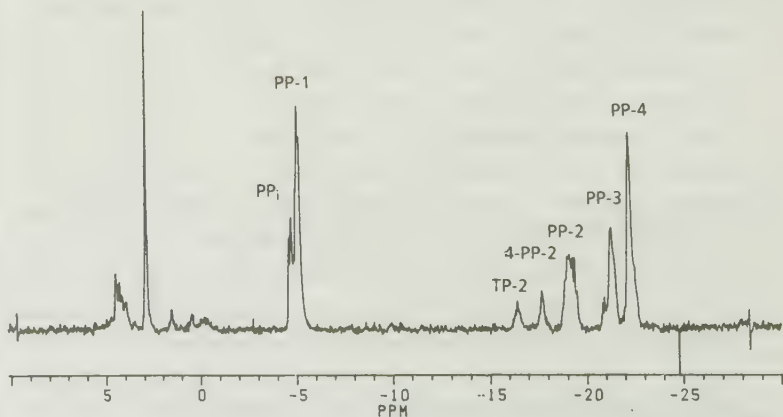


Abbildung 6-4: Der Einfluß von Me_2^{2+} auf das ^{31}P -Spektrum eines polyP-haltigen Extraktes

Extrakt von Abbildung 6-3a mit Mg_2^{2+} im Medium (vor der Zugabe von EDTA)

Die polyP-haltigen Extrakte enthielten Gemische kürzerkettiger polyP. Die mittlere Kettenlänge läßt sich aus dem Intensitätsverhältnis der terminalen zu den nichtterminalen Signalen ermitteln (die Intensität des terminalen Signals entspricht jeweils zwei Monomeren). Sie liegt bei 6 bis 8 (ohne Berücksichtigung von PP_1) und ist in beiden alkalischen Fraktionen etwa gleich.

Die Ähnlichkeit der beiden alkalischen Extrakte spricht dafür, daß eine Zuordnung des Inhalts einer speziellen Fraktion zu einem speziellen Reservoir von polyP, das auch in vivo von anderen Reservoiren unterschieden ist, bei *Platymonas* nicht zulässig ist (anders als etwa bei *Chlorella*, in der unterschiedliche polyP-Fractionen unterschiedlich metabolisiert werden: Miyachi et al. 1964). Auf *Platymonas* scheint eher Harolds (1966) Vermutung zuzutreffen, daß polyP sich in den intakten Zellen frei im Cytoplasma befindet. Erst bei der Extraktion bilden sich Aggregationen von polyP-Ketten mit Proteinen oder Membranbestandteilen, wodurch polyP säureunlöslich wird. Die unterschiedliche Löslichkeit von polyP in verschiedenen Überständen beruht dann auf der unterschiedlichen Stabilität der Zellrückstände gegenüber der Extraktionsprozedur, und nicht auf der Existenz von polyP in verschiedenen Bindungszuständen in der Zelle vor der Extraktion. Die häufig beobachtete Korrelation von polyP-Kettenlänge (ermittelt zum Beispiel durch Endgruppentitration) mit der Reihenfolge der Extraktionsstufen steht hierzu nicht im Widerspruch: es ist plausibel, daß Komplexe mit längeren polyP-Ketten stabiler sind und daher auch erst in späteren Stufen der Fraktionierung aufgelöst werden können.

Die im Extrakt bestimmte mittlere Kettenlänge von polyP kann daher nur als eine untere Schranke der mittleren Kettenlänge von polyP in vivo angesehen werden.

Das polyP-Signal von *Platymonas* hat mit etwa 5 bis 6 ppm eine deutlich größere Linienbreite als die entsprechenden Signale bei Bakterien (Ostrovskii et al. 1980), Hefe (0,5 bis 1 ppm, Navon et al. 1979) sowie der Alge *Chlorella* (2 bis 4 ppm, Sianoudis et al. 1986a), die ebenfalls bei einem B_0 von 8,45 T gemessen worden sind. Für diese Tatsache sind mehrere Erklärungen möglich: in der großen Breite des Signals können sich eine andere Zusammensetzung, eine stärkere Komplexbildung mit paramagnetischen Ionen oder besondere Konformationszustände widerspiegeln.

Die Spektren in Abbildung 6-3a und 6-3b zeigen polyP-haltige Extrakte nach Zugabe von EDTA, das heißt bei weitgehender Abwesenheit freier zweiwertiger Ionen. Vor der Zugabe von EDTA (beziehungsweise nach der Zugabe von Mg^{2+}) erhält man das Spektrum in Abbildung 6-4, das die tatsächlichen Signallagen der im Extrakt enthaltenen polyP-Spezies im Mg^{2+} -haltigen Cytoplasma eher nachbilden dürfte. Die Zuordnung der Signale erfolgt aufgrund der Titration kommerziell erhältlicher Na^+ -Salze von polyP unterschiedlicher Kettenlängen (siehe Anhang 3). Die Extrakte zeigen ein Gemisch von Oligophosphaten und längerkettigem polyP. Die mittlere Kettenlänge liegt bei 6 - 8, wenn das im Mg^{2+} -freien Extrakt unterscheidbare PP_i von der Menge der terminalen Phosphate abgezogen wird. Wenn nur PP-4 mit PP-3 verglichen wird, wodurch polyP kürzerer Kettenlänge (< 7) bei der Mittelwertbildung unberücksichtigt bleibt, erhält man Kettenlängen um 11. Eine maximale Länge läßt sich nicht angeben, da die Signallagen längerer Ketten identisch sind. Der Vergleich des Spektrums in Abbildung 6-4 mit einem in vivo-Spektrum zeigt, daß die nichtterminalen Signale aller polyP im Extrakt vom in vivo-Signal eingehüllt werden. Sie allein können aber das in vivo-Signal nicht erklären, da dessen niederfrequente Seite nicht von in vitro feststellbaren Signalen ausgefüllt wird. Die Existenz verschiedener Oligophosphate im Cytoplasma ist nicht ausgeschlossen. Es ist aber auch möglich, daß bei den durchgeführten Extraktionen überwiegend kürzere Bruchstücke von polyP in Lösung gehen.

Eine alternative Extraktionsmethode ist die Permeabilisierung der Zellmembran durch EDTA. Bei der Untersuchung der Lokalisation von polyP durch Zugabe von 100 mmol l^{-1} EDTA (siehe Kap. 6.2) trat polyP aus den Zellen aus, das keiner extremen Ansäuerung oder Alkalisierung ausgesetzt war. Da die Zellen weitgehend intakt blieben, fand auch keine Komplexierung mit Zellbruchstücken in großem Umfang statt. In diesem Fall wurde eine Kettenlänge von über 40 Monomeren gemessen (die Intensität von PP-1 konnte nur nach oben abgeschätzt werden, da sein Signal nicht aus dem Rauschen hervortrat). Dies spricht eher dafür, daß der Anteil von kürzerkettigen Phosphaten in intakten Zellen eher gering ist; sie wären sonst auch bei EDTA-Extraktion in größerer Menge in das Medium gelangt. Außerdem wäre in diesem Fall ein größeres Signal terminaler Phosphate zum Beispiel dann sichtbar, wenn ATP und ADP bei saurer Belastung der Zellen im Spektrum nicht zu sehen sind (siehe in Abb. 5-14 die Zellen bei $pH_{\text{ext}} < 4,1$).

6.3.2 Untersuchungen an künstlichen Polyphosphaten

Das Medium, in dem *Platymonas subcordiformis* kultiviert wurde, enthielt auch paramagnetische Ionen wie Mn^{2+} und Fe^{2+} (siehe Tab. 5-1). Beide Ionenarten sind notwendig für den Aufbau wichtiger Enzyme und müssen daher von den Zellen aufgenommen werden. Zumindest teilweise werden in das Cytoplasma gelangte Ionen an cytoplasmatisches polyP gebunden werden. Um zu überprüfen, ob auch die Komplexierung von Mn^{2+} die Breite des in vivo-Signals von polyP erklären kann, sind Experimente mit kommerziell erhältlichem polyP größerer Kettenlänge (Na-Phosphatglas, Kettenlänge 65 ± 5 , bzw. Kettenlänge 15 ± 3 ("Calgon"; Sigma Chemie)) durchgeführt worden.

Die schrittweise Zugabe von Mn^{2+} zu Na-PP (Calgon) führt zu keiner nennenswerten Verbreiterung des Mittelgruppensignals PP-4. Bei einer Konzentration von $1,2 \text{ mmol l}^{-1} \text{ MnCl}_2$ (bei 40 mmol l^{-1} Phosphatmonomere), die weit über zu erwartenden intrazellulären Mn^{2+} -Konzentrationen liegt, beträgt die Signalbreite bei halber Höhe ($\Delta\nu_{1/2}$) $50 \text{ Hz} \hat{=} 0,34 \text{ ppm}$ (statt $\sim 4 \text{ Hz}$ bei reinem Na-PP). Mg^{2+} -komplexiertes polyP zeigt jedoch schon bei kleinen Mengen von Mn^{2+} in der Lösung drastisch verbreiterte Linien ($\Delta\nu_{1/2} = 220 \text{ Hz} \hat{=} 1,5 \text{ ppm}$ bei $0,04 \text{ mmol l}^{-1} \text{ MnCl}_2$ und $15 \text{ mmol l}^{-1} \text{ MgCl}_2$). Die Linienbreite hängt im wesentlichen linear von $[\text{Mn}^{2+}]$ ab, wobei die Steigung $\Delta(\Delta\nu_{1/2})/\Delta[\text{Mn}^{2+}]$ ihrerseits vom Verhältnis $[\text{Mg}^{2+}]/[\text{PO}_3]$ abhängt. Diese Abhängigkeit ist in Abbildung 6-5 dargestellt. Das Relaxationsvermögen eines Mn^{2+} -Ions wächst monoton mit $[\text{Mg}^{2+}]$.

Während die jeweils gemessene Breite der Linie selbst unter anderem vom Komplexierungszustand des polyP an Mg^{2+} abhängt, dürfte die Zunahme der Linienbreite mit steigender Mn^{2+} -Konzentration nicht auf Austauscheffekten zwischen Mg^{2+} - und Mn^{2+} -komplexiertem polyP beruhen, da dieser Effekt auch auftritt, wenn die eingesetzten Mn^{2+} -Konzentrationen nur einige Prozent oder Bruchteile von Prozenten der eingesetzten Mg^{2+} -Konzentrationen ausmachen. Die Linienbreite ist daher als ein Maß für die transversale Relaxation anzusehen, die durch das als Relaxationszentrum wirkende paramagnetische Mn^{2+} -Ion beschleunigt wird. Die Wirkung eines derartigen Relaxationszentrums wird beschrieben durch (Martin et al. 1980)

$$\frac{1}{T_2} = \left(\frac{\mu_o}{4\pi} \right)^2 \frac{S(S+1)}{15} g^2 \beta^2 \gamma_N^2 \frac{1}{r^6} \cdot \quad (6.1)$$

$$\left(4\tau_d + \frac{3\tau_d}{1 + \omega_N^2 \tau_d^2} + \frac{13\tau_d}{1 + \omega_S^2 \tau_d^2} \right)$$

für den Dipol-Dipol-Anteil der Relaxation mit:

g : Landé-Faktor der Elektronen

β : Bohr'sches Magneton

γ_N : Nukleares gyromagnetisches Verhältnis

r : Abstand des beobachteten Kernes vom paramagnetischen Zentrum

ω_S, ω_N : Larmorfrequenzen von Elektronenspin und Kernspin

S : Spinzustandszahl der Elektronenhülle des paramagnetischen Zentrums

(bei Lanthaniden ist statt S die Quantenzahl J zu nehmen).

τ_d setzt sich aus mehreren Anteilen zusammen:

$$\frac{1}{\tau_d} = \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_S} + \frac{1}{\tau_m} \quad (6.1a)$$

mit τ_r : Korrelationszeit für die Rotation des Abstandsvektors des ungepaarten Elektrons zum Kern

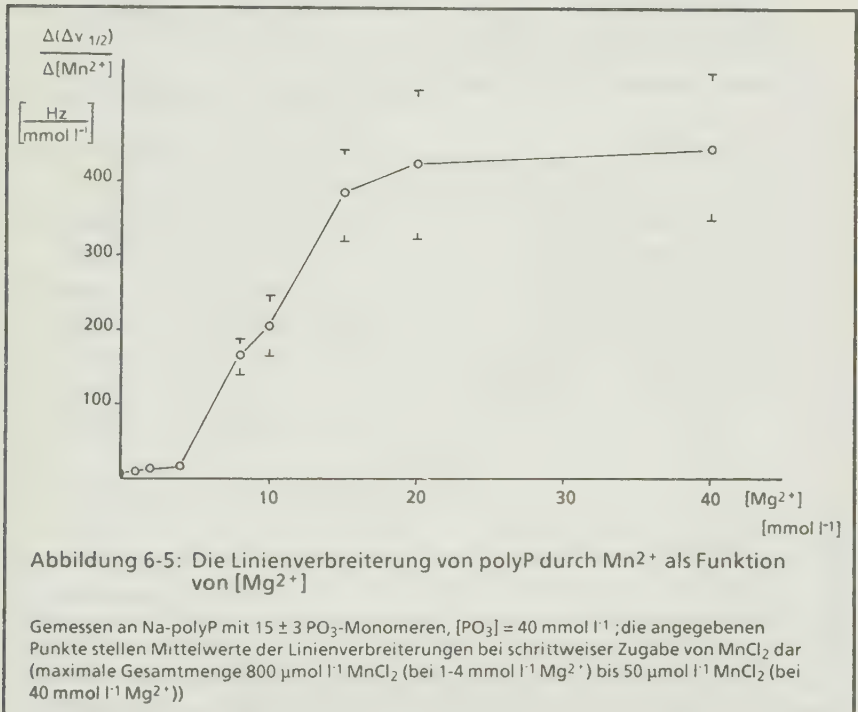
τ_S : Elektronische Relaxationszeit

τ_m : Lebensdauer des Liganden in komplexierter Form.

Neben dem Dipol-Dipol-Anteil wirken noch andere Relaxationsmechanismen, zum Beispiel die Kontakt-Wechselwirkung, die im Gegensatz zu ersterem vom Abstand r unabhängig ist. Die Komplexbildung des Mn^{2+} am polyP ändert sich natürlich mit steigender Mg^{2+} -Konzentration. Eine Verdrängung von Mn^{2+} durch Mg^{2+} würde aber eine verringerte Wirkungsmöglichkeit des Relaxationszentrums Mn^{2+} bedeuten, also eine Linienverschmälerung mit wachsender Mg^{2+} -Konzentration; das Gegenteil wird beobachtet!

Die Vergrößerung der Linienbreite, das heißt von T_2^{-1} , mit wachsenden $[Mg^{2+}]$ wird wahrscheinlich dadurch hervorgerufen, daß der Abstand r vom Phosphorkern zum Mn^{2+} -Ion mit steigender Mg^{2+} -Konzentration abnimmt. Das ließe sich so erklären, daß die polyP-Kette zum Beispiel

eine gewundene Konformation besitzt und daß die Windungen mit steigender Mg^{2+} -Komplexierung enger werden. Damit könnte der mittlere Abstand eines Relaxationszentrums, das an das polyP gebunden wird, zu benachbarten Phosphorkernen abnehmen.



Glonek et al. (1975b) nehmen an, daß die Änderung der chemischen Verschiebung - das heißt die Änderung der magnetischen Abschirmung der ^{31}P -Kerne in den mittleren Gruppen langer Phosphatketten bei der Komplexierung beziehungsweise Dekomplexierung - auf eine veränderte Konformation der Phosphatketten zurückzuführen ist. Es wird eine helikale Struktur der polyP-Ketten in wässriger Lösung angenommen. Aus der Existenz eines Knickpunktes bei der Darstellung der Signallage des PP-4 in Abhängigkeit von der Menge zugefügten Magnesiums wird auf die besondere Stabilität eines Komplexes geschlossen, bei dem 4 PO_3 -Monomere an ein Mg^{2+} gebunden sind, und zwar in der Weise, daß die polyP-Kette helikal um das Mg^{2+} -Ion gewunden ist, wobei jeweils 4 PO_3 -Monomere in einer Umdrehung sitzen (Glonek 1978). Die Existenz eines 4:1-Komplexes ist auch mit Gel-chromatographischen Methoden

bestätigt worden, gleichzeitig wird aus diesen Ergebnissen auf die Existenz von Komplexen der Verhältnisse 6:1 und 5:1 geschlossen (Onaka et al. 1981).

Die Bestätigung für die Existenz weiterer mehr oder weniger stabiler Komplexierungsstufen für Mg^{2+} an Na-polyP über den 4:1-Komplex hinaus ist in Abbildung 6-6 gezeigt.

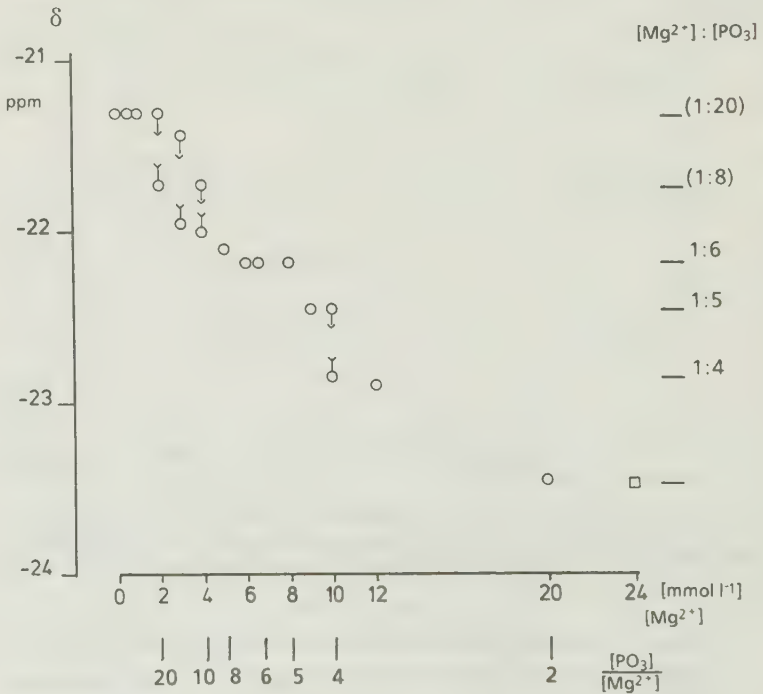


Abbildung 6-6: Die stufenweise Verschiebung des Signals PP-4 bei Komplexbildung von Mg^{2+} an polyP

gemessen an polyP mit 65 ± 5 Monomeren; $[\text{PO}_3] = 40 \text{ mmol l}^{-1}$ (□ : Meßwert an polyP mit 15 ± 3 Monomeren)

Die Zugabe von Mg^{2+} in kleinen Schritten zu Na-polyP der Kettenlänge 65 ± 5 (Monomerkonzentration 40 mmol l^{-1}) führt nicht zu einer kontinuierlichen Verschiebung von $\delta(\text{PP-4})$ mit wachsender Mg^{2+} -Konzentration; vielmehr sind deutlich ausgeprägte Stufen zu erkennen, die jeweils

unterschiedliche Komplexe repräsentieren. Der Übergang von einem Komplex zu einem anderen nach Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration erfolgt in der Größenordnung von Minuten, so daß unterschiedliche Zustände gleichzeitig existieren und auch im Spektrum dargestellt werden können. Abbildung 6-7 zeigt den Übergang vom Zustand, der durch eine chemische Verschiebung $\delta = -22,45$ charakterisiert wird, zum Zustand mit $\delta = -22,85$, der den 4:1-Komplex repräsentiert. Die vollständige Einstellung des neuen Zustandes war nach 50 min noch nicht abgeschlossen.

Die in Abbildung 6-6 angegebene Zuordnung von Komplexierungsstufen zu Verschiebungen ist bei kleinen Mg^{2+} -Konzentrationen nicht exakt. Weitere Stufen als die angezeigten sind nicht ausgeschlossen, da bei der Aufnahme der Spektren die Umlagerung der Komplexe nicht in jedem Fall abgeschlossen war. Parallelversuche an Calgon zeigten die gleichen Ergebnisse bei Komplexierungsverhältnissen von 1:5 und höheren Mg^{2+} -Konzentrationen. Eine Verschiebung über $-23,5$ ppm hinaus (entsprechend dem 1:2-Komplex) ist auch bei $[\text{Mg}^{2+}] \geq 40 \text{ mmol l}^{-1}$ und $[\text{PO}_3] = 40 \text{ mmol l}^{-1}$ nicht feststellbar.

6.3.3 Deutung der Meßergebnisse

Der Vergleich der Abbildung 6-5 mit 6-6 zeigt, daß sowohl $\delta(\text{PP-4})$ als auch $\Delta(\Delta\nu_{1/2})/\Delta[\text{Mg}^{2+}]$ sich im Bereich von $4 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ bis $20 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ besonders ausgeprägt ändern. Die Annahme, daß polyP eine helikale Struktur besitzt, die mit zunehmendem Komplexierungsgrad an Mg^{2+} enger wird, liefert eine Erklärung für beide Abhängigkeiten gleichermaßen.

Meßergebnisse von Glonek et al. (1975a) deuten darauf hin, daß in Na^+ -freien Lösungen von polyP die Komplexierungs- und Konformationsstufen anders liegen. Auch führt die Komplexierung von Ca^{2+} statt Mg^{2+} bei gleichen Konzentrationsverhältnissen nur zu geringeren Abweichungen des $\delta(\text{PP-4})$ von der Signallage unkomplexierten Na-polyP ($\delta(\text{PP-4})$ liegt um -22 ppm bei $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ und $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ PO}_3$ -Monomere; außerdem ist $\delta(\text{PP-4})$ von Ca^{2+} -komplexiertem polyP im Gegensatz zu Mg^{2+} -komplexiertem polyP etwas abhängig von pH). Bei Anwesenheit von sowohl Mg^{2+} als auch Ca^{2+} im Medium liegt $\delta(\text{PP-4})$ abhängig vom Verhältnis der beiden Ionen zwischen den jeweiligen Werten für den Mg^{2+} - und dem Ca^{2+} -Komplex.

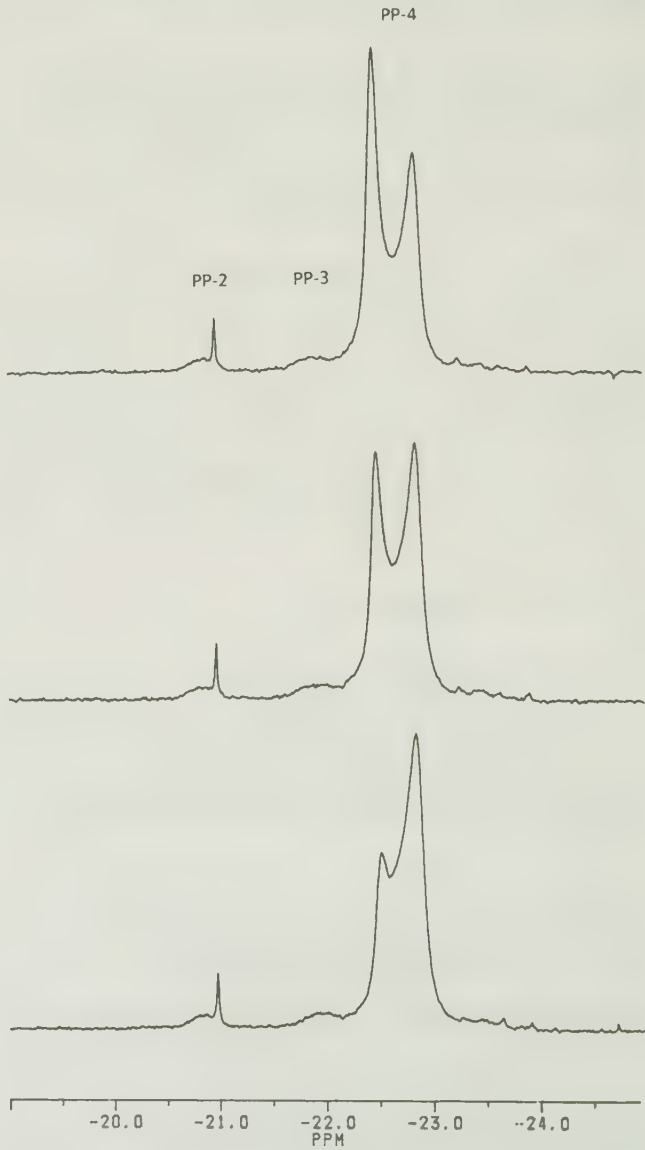


Abbildung 6-7: Der Übergang von einer Komplexierungsstufe zur nächsten

^{31}P -Spektrum von polyP nach Erhöhung von $[\text{Mg}^{2+}]$ von $9,0 \text{ mmol l}^{-1}$ auf 10 mmol l^{-1} ($[\text{PO}_3] / [\text{Mg}^{2+}] = 4$) sowie zwei weitere im Abstand von je 10 min aufgenommene Spektren

Unter in vivo-Bedingungen liegt die Spitze des polyP-Signals bei -22 ppm. Das entspricht ungefähr dem PP-4-Signal im Eichmedium für die pH-Kurve des intrazellulären P_i (siehe Kap. 5.4), in dem auf 105 mmol l^{-1} Phosphatmonomere 16 mmol l^{-1} Mg^{2+} und 15 mmol l^{-1} Ca^{2+} entfallen. Diesem Mengenverhältnis würde ein Mg^{2+} -Komplex von 1:5 entsprechen, mit einem $\delta(PP-4)$ von -22,5 ppm. Die Anwesenheit von Ca^{2+} verschiebt das Signal etwas zu tieferen Frequenzen, was als eine weniger enge Windung der Helix um komplexiertes Ca^{2+} interpretiert werden kann. Intrazellulär liegt polyP dementsprechend wahrscheinlich als im Cytoplasma schwimmende Helix mit mehr als 5 Phosphatmonomeren pro Windung vor. Unter diesen Umständen an polyP gebundenes Mn^{2+} kann als effektives Relaxationszentrum wirken und die große Linienbreite des polyP erklären. Im Eichmedium führen 0,16 mmol l^{-1} Mn^{2+} zu einem polyP-Signal, dessen Linienform der in intakten Zellen ähnlich ist (Abb. 6-8).

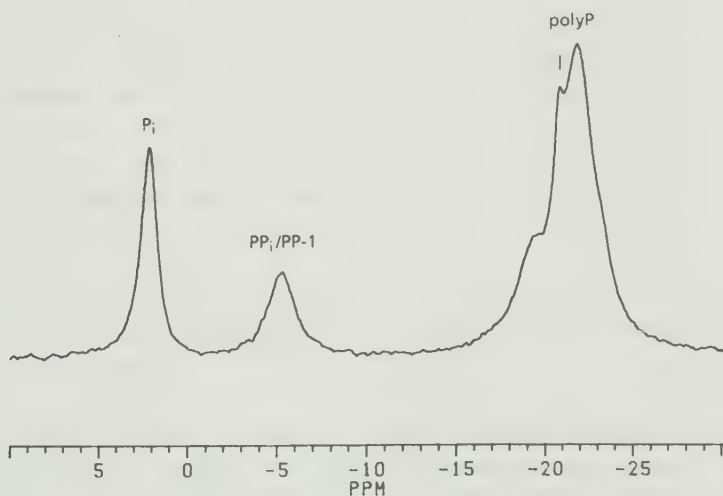


Abbildung 6-8: ^{31}P -Spektrum der zur Nachbildung des intrazellulären Milieus verwendeten pH-Eichlösung (nach Kap. 5) nach Zugabe von 160 $\mu\text{mol } l^{-1}$ $MnCl_2$

(das Signal bei -20,3 ppm stammt von Metaphosphat, das sich in der Eichlösung gebildet hat; das Signal $PP_i/PP-1$ ist wegen teilweiser Hydrolyse des polyP etwas vergrößert)

Die Kettenlänge des polyP hängt möglicherweise von der Menge des in der Zelle gespeicherten Phosphats ab, das heißt, daß mit wachsender Phosphatmenge in der Zelle nicht die Zahl der Phosphatketten, sondern ihre Länge zunimmt. Vermutlich liegt polyP - ähnlich wie Stärke - auch deshalb polymerisiert vor, weil so große Mengen des zu speichernden Materials im Zellinneren eingelagert werden können, ohne daß das osmotische Potential zu stark erhöht wird. In einer marinen Alge ist eher eine höhere intrazelluläre Osmolarität erforderlich, so daß zum Beispiel bei *Platymonas* auch ein geringerer Polymerisierungsgrad ertragen werden könnte. Es ist daher möglich, daß hier die bei Hefe gemessenen extremen Kettenlängen von über 100 Einheiten nicht auftreten.

Auf die mögliche Rolle von polyP als Energie- oder Phosphatspeicher wurde in Kapitel 5.5.3 eingegangen.

7. Anwendung der ^{23}Na -Spektroskopie auf *Platymonas*

7.1 Einführung: ^{23}Na in vivo-Spektroskopie seit Einführung der Verschiebungsreagenzien

Es wird vermutet, daß Transportprozesse über die Plasmamembran bei marinen Algen weniger an den Kotransport von Protonen (wie bei Süßwasserorganismen) sondern eher an den Kotransport von Na^+ gekoppelt sind (Raven und Smith 1980). Daher ist die Verfolgung von Na^+ -Konzentrationen im Zellinneren von Interesse.

Wegen der hohen extrazellulären Na^+ -Konzentration ist die Bestimmung von intrazellulärem Na^+ bei marinen Algen mit technischen Schwierigkeiten verbunden, wenn Methoden wie Atomabsorptionsspektroskopie oder Flammenphotometrie angewendet werden. Einerseits muß das extrazelluläre Na^+ vor der Bestimmung von Na^+ vollständig von der Zelle entfernt sein, zum Beispiel durch intensives Waschen mit geeigneten Medien. Andererseits muß sichergestellt sein, daß sich die intrazelluläre Na^+ -Konzentration nicht durch Natriumexport aus der Zelle während des Waschens verändert, sei es durch Stoffwechselprozesse, sei es durch Beschädigung der Zelle. Methoden, bei denen extrazelluläres Na^+ durch Bestimmung des extrazellulären Partialvolumens berücksichtigt wird, führen wegen der zu erwartenden großen Konzentrationsdifferenzen zwischen Innenraum und Außenraum schon bei kleinen Unsicherheiten bezüglich des extrazellulären Na^+ zu großen Fehlern.

Dagegen erlaubt die ^{23}Na -Kernspinresonanzspektroskopie grundsätzlich die gleichzeitige Beobachtung getrennter Signale von extra- und intrazellulärem Natrium.

Gupta und Gupta (1982) haben an Erythrozyten und Muskelgewebe gezeigt, daß ein Komplex von Dysprosium $^{3+}$ und Tripolyphosphat die Resonanzfrequenz von extrazellulärem Natrium verschiebt, wenn er dem Medium zugefügt wird. Da das Signal intrazellulären Natriums nicht verschoben wird, ist auf diese Weise eine Unterscheidung von intra- und extrazellulärem Natrium möglich. Seitdem sind außer dem Dysprosium-Tripolyphosphatkomplex einige weitere Verschiebungsreagenzien - vor allem ein Komplex von Dy^{3+} und TTHA - zur Beobachtung von intrazellulärem Natrium und Kalium verwendet worden. Untersucht wurden vor

allem Erythrozyten (Pike et al. 1984, Pettegrew et al. 1984, Boulanger et al. 1985, Cowan et al. 1985), aber auch Hefe (Balschi et al. 1982, Ogino et al. 1983, Höfeler et al. 1987), Maiswurzelspitzen (Gerasimowicz et al. 1986), Suspensionen von Hirsezellen (*Panicum miliaceum*) (Sillerud und Heyser 1984), *E. coli* (Castle et al. 1986) und der Schleimpilz *Dyctiostelium* (Martin et al. 1987) sowie Gewebe wie menschliche Linsen (Fossarello et al. 1985) und perfundierten Rattenherzen (Pike et al. 1985). Bei diesen Systemen liegt $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ nicht über 135 mM. Bei marinen Organismen liegen externe Na^+ -Konzentrationen um 400 mM, so daß erhöhte Anforderungen an die Verschiebungsreagenzien gestellt werden müssen, um trotz der hohen Natriumkonzentrationen eine ausreichende Verschiebung zu erhalten.

In diesem Kapitel wird die Anwendung von Verschiebungsreagenzien zur Bestimmung der intrazellulären Na^+ -Konzentration von *Platymonas subcordiformis* dargestellt. Zunächst werden einige Unterschiede der ^{23}Na -Spektroskopie zur ^{31}P -Spektroskopie erläutert, danach Wirkung und Anwendung zweier Verschiebungsreagenzien beschrieben. Schließlich werden die Meßergebnisse vorgestellt und diskutiert.

7.2 Die Linienform der Resonanzen von Kernen mit $I = 3/2$

^{23}Na ist das natürlich vorkommende Isotop des Natriums mit einem γ von 11,27 MHz T^{-1} . Seine Häufigkeit von 100 % und seine relative Empfindlichkeit (bei gleicher Zahl der Kerne) von 1,40 verglichen mit ^{31}P macht es zu einem geeigneten Kern für die NMR-Spektroskopie. Nachteilig ist, daß ^{23}Na einen Kernspin $I = 3/2$ und ein Quadrupolmoment von $1,4 \cdot 10^{-29} \text{ m}^2$ besitzt; die Linien können infolge dessen verbreitert sein und haben nicht grundsätzlich die Form einer Lorentzkurve. Andererseits erlauben die kurzen Relaxationszeiten (von 30 - 60 ms bei einer Frequenz von 52,92 MHz; Pettegrew et al. 1984) schnelle Pulsfolgen und damit Messungen mit hoher Empfindlichkeit.

Bei einem System mit Spin $3/2$ sind drei Übergänge mit $\Delta m = \pm 1$ möglich; neben dem Übergang $m = +1/2$ nach $-1/2$ sind die Übergänge $m = 3/2$ nach $1/2$ und $m = -1/2$ nach $-3/2$ möglich. Im Festkörper wird die Entartung dieser drei Übergänge durch Quadrupolwechselwirkung aufgehoben, so daß das Spektrum dieser Übergänge aus drei Linien besteht: einer zentralen, die $m = +1/2 \rightarrow -1/2$ repräsentiert, und beiderseits da-

von im gleichen Abstand zwei Satellitensignale. Deren Abstand voneinander ist

$$\Delta\omega(I=3/2) = \frac{1}{4} - \frac{e^2 q Q}{\hbar} (1 - 3 \cos^2 \theta) \quad (7.1)$$

(eq $\hat{=}$ elektrischer Feldgradient am Kernort; Q = elektrisches Quadrupolmoment)

in einem Festkörper mit axialer Symmetrie, wobei θ der Winkel zwischen der Hauptachse der Quadrupolwechselwirkung und dem äußeren Feld B_0 ist. Die relativen Intensitäten der drei Spektrallinien sind 3:4:3 (Abragam 1961).

In wässriger Lösung wird die Abhängigkeit von θ durch die isotropen Bewegungen der Kerne ausgemittelt, so daß die Aufspaltung der Linien verschwindet. Die Zusammensetzung der Resonanzlinien aus unterschiedlichen Anteilen manifestiert sich aber darin, daß diese Komponenten unterschiedliche Relaxationsverhalten zeigen.

T_1 und T_2 werden bei ^{23}Na durch fluktuierende elektrische Quadrupolwechselwirkungen spezifisch bestimmt. Die beiden transversalen Relaxationsraten für Kerne mit $I = 3/2$ werden beschrieben durch

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)_I = \frac{(e^2 q Q)^2}{\hbar^2 20} \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right) \tau_c \left[\frac{1}{1 + \omega_o^2 \tau_c^2} + \frac{1}{1 + 4\omega_o^2 \tau_c^2} \right] \quad (7.2)$$

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)_{II} = \frac{(e^2 q Q)^2}{\hbar^2 20} \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right) \tau_c \left[1 + \frac{1}{1 + \omega_o^2 \tau_c^2} \right] .$$

$(1/T_2)_I$ charakterisiert die Relaxation von 40 % des Signals und kann dem Übergang $m = +1/2 \rightarrow -1/2$ zugeordnet werden. Die übrigen 60 % des Signals zerfallen mit der Rate $(1/T_2)_{II}$ und können den Übergängen $m = +3/2 \rightarrow +1/2$ sowie $m = -1/2 \rightarrow -3/2$ zugeordnet werden.

Bei schnellem Austausch von Kernen in Phasen, die durch unterschiedliche τ_c , q und η gekennzeichnet sind, ergibt sich ein gemittelttes Signal mit Relaxationszeiten, die den (den jeweiligen Konzentrationen gemäß) gewichteten Mittelwerten von $T_{2(I)}$ beziehungsweise $T_{2(II)}$ in den ver-

schiedenen Phasen entsprechen. Es gilt $(1/T_2)_I \leq (1/T_2)_{II}$. In niederviskosen Systemen mit sehr kleinen τ_c ($\hat{=}$ extreme motional narrowing) ist $(\omega_0 \tau_c)^2 \ll 1$ und deshalb $(1/T_2)_I = (1/T_2)_{II}$. Die im Spektrum beobachtbare Linie ist lorentzförmig und hat die Halbwertsbreite $(\pi T_2)^{-1}$. Wenn τ_c größer wird, sei es, daß die Kerne sich in einem viskoserem Medium befinden, sei es, daß ein schneller Austausch zwischen Natrium mit einer mobilen und einer weniger mobilen Phase zu einem gemittelten τ_c führt, das nicht mehr klein gegen ω_0^{-1} ist, erhält man als Signal die Überlagerung zweier Lorentzlinien unterschiedlicher Halbwertsbreiten. Die schmalere Linie enthält 40 % der Signalintensität, die breitere 60 % (Civan und Shporer 1978).

7.3. Verschiebungsreagenzien

7.3.1 Die Wirkungsweise von dysprosiumhaltigen Verschiebungsreagenzien

Für die ^{23}Na -Spektroskopie verwendete Verschiebungsreagenzien bestehen aus dreiwertigen Ionen der Lanthaniden, die an einen Komplexbildner gebunden sind. Die größten Verschiebungseffekte werden mit Dysprosium erzielt. Das Dysprosium-Ion besitzt durch seine unvollständig gefüllte 4f-Schale ein magnetisches Moment von etwa $10,6 \mu_B = 9,83 \text{ Am}^2$. Das Ion wird an einen geeigneten Komplexbildner gebunden, der weitere Bindungsstellen zur zeitweiligen Aufnahme einwertiger Kationen besitzt. Ein daran gebundenes Na^+ -Ion ist neben dem B_0 -Feld dem magnetischen Moment des Dy^{3+} ausgesetzt, wodurch seine Resonanzfrequenz gegenüber dem ungebundenen Zustand verschoben wird. Schneller Austausch freier und an den Komplexbildner gebundener Na^+ -Ionen führt zu einem einzelnen gemittelten Signal, das zwischen den Frequenzen beider Spezies liegt. Die genaue Frequenz des gemittelten Signals hängt ab vom Verhältnis der beiden Ionenspezies und damit von der Konzentration des Verschiebungsreagens [SR] im Na^+ -haltigen Medium. Im einfachsten Fall ist die Abhängigkeit linear (siehe Abb. 7-1a).

Einen Überblick über mögliche Verschiebungsreagenzien findet man in den Arbeiten von Pike und Springer (1982), Pike et al. (1983) sowie Chu et al. (1984).

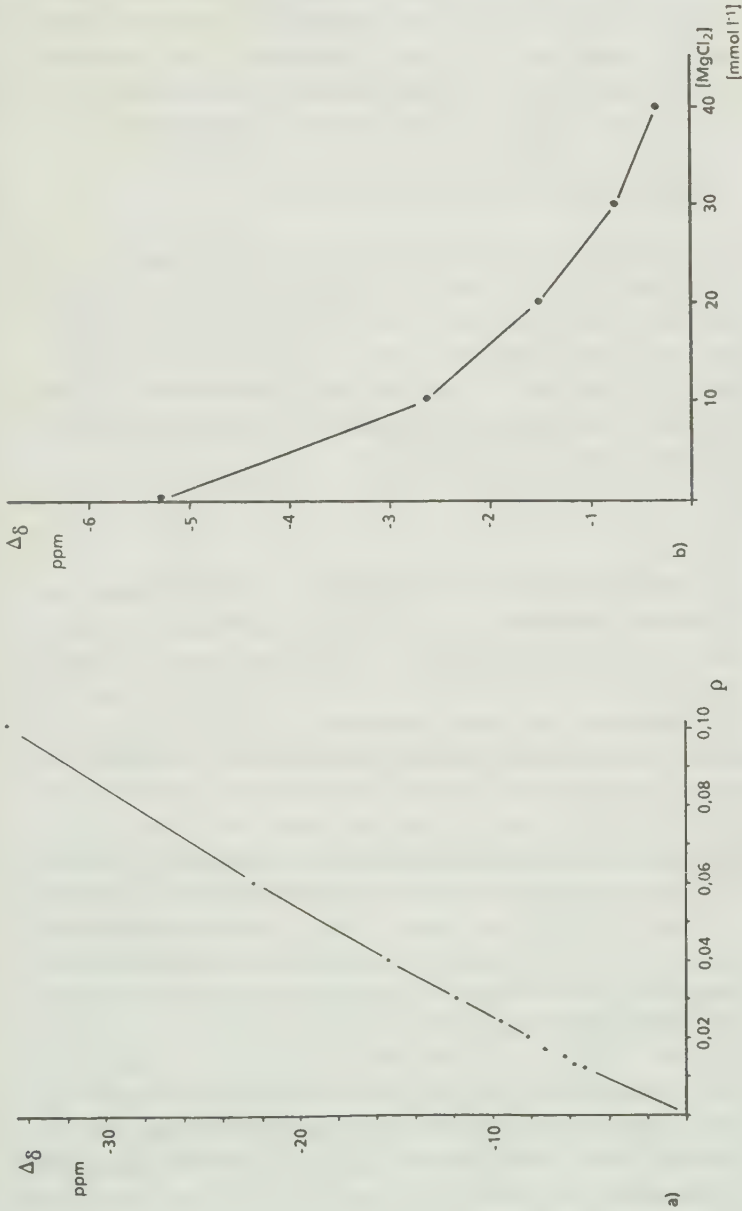


Abbildung 7-1: Die Verschiebungswirkung von DyTP₂ auf Na⁺

a) $\Delta\delta$ als Funktion von p

b) $\Delta\delta$ als Funktion von $[Mg^{2+}]$

($p = [SR]/[Na^+]$, mit $[SR] = [Dy^{3+}] = 6\ mmol\ l^{-1}$; $[Na^+] = 10 \cdot [SR] + [NaCl]_{extr.}$, wobei $NaCl_{ext}$ zur Probe zugefügtes $NaCl$ ist; $[NaCl]_{ext}$ läuft von 0 bis $0.5\ mol\ l^{-1}$)

Bis auf wenige Ausnahmen ist bei bisherigen Untersuchungen Tripolyphosphat (TP) oder Triethylentetraaminhexaacetat (TTHA) als Komplexbildner verwendet worden. Da diese in Verbindung mit Dy^{3+} die größten Verschiebungen $\Delta\delta$ des Na^+ -Signals hervorrufen, sind sie auch für die Untersuchungen an *Platymonas subcordiformis* verwendet worden.

7.3.2 Herstellung und Eigenschaften von DyTP_2

Der Dysprosium-Tripolyphosphat-Komplex erzeugt von allen bisher bekannten Reagenzien die größte Verschiebung, und zwar zu niedrigeren Frequenzen (Chu et al. 1984). Er hat die Summenformel $(\text{Dy}(\text{P}_3\text{O}_{10})_2)^{7-}$ (im folgenden als DyTP_2 bezeichnet) und läßt sich leicht herstellen, indem DyCl_3 gelöst oder in fester Form stöchiometrisch unter Rühren einer Lösung von $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ zugefügt wird. Die Stammlösung enthält dann pro mol Dy^{3+} 10 mol Na^+ , so daß stets

$$\rho := \frac{[\text{SR}]}{[\text{Na}^+]} \leq 0,1 \quad .$$

Angesichts der hohen Na^+ -Konzentrationen im Seewasser-Medium wird das Verhältnis von intra- zu extrazellulärem Natrium durch das zusätzliche Na^+ im Verschiebungsreagens nur wenig beeinflusst, so daß auf einen Austausch von Na^+ gegen andere Kationen verzichtet wurde. Bei der rechnerischen Auswertung von Messungen muß der Na^+ -Gehalt der Stammlösung des Verschiebungsreagens selbstverständlich berücksichtigt werden.

Die Frequenzverschiebung $\Delta\delta$ zu niedrigeren Frequenzen als Funktion von ρ ist in Abbildung 7-1a dargestellt. Der Austausch von gebundenem und freiem Na^+ erfolgt so schnell, daß die Linienverbreiterung durch Austausch und durch zusätzliche Relaxation im homogenen Feld gegenüber anderen Effekten bei der in vivo-Spektroskopie keine Rolle spielt (siehe Kap. 4.1.3.4).

Der Dysprosiumkomplex ist kinetisch so stabil, daß ^{31}P -Spektren getrennte Signale für im Komplex eingebautes Tripolyphosphat und überschüssiges freies Tripolyphosphat zeigen (Abb. 7-2). Die terminalen Phosphatgruppen erscheinen im Komplex bei +135 ppm, die Mittelgruppe bei +230 ppm; beide Signale sind etwa 7 ppm breit.

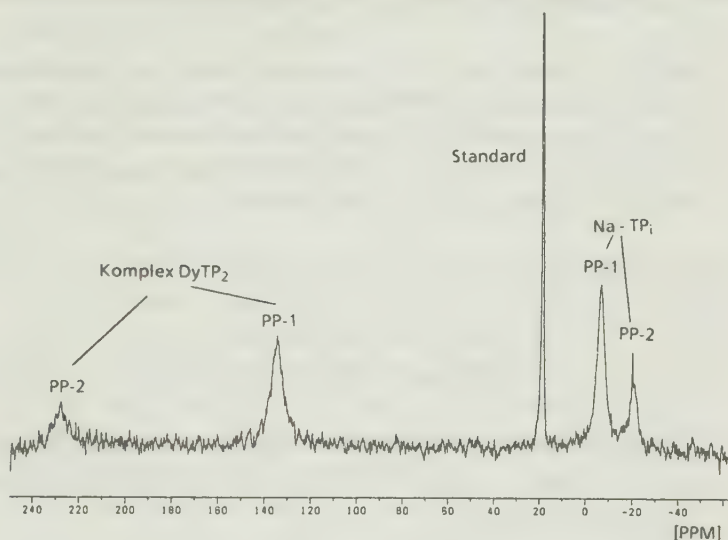


Abbildung 7-2: ^{31}P -Spektrum des DyTP_2 -Komplexes

$[13,3 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10} + 4 \text{ mmol l}^{-1} \text{ DyCl}_3]$

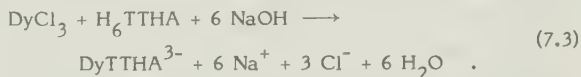
Einen drastischen Einfluß auf Δ_δ hat die Anwesenheit zweiwertiger Kationen; offenbar läßt deren hohe Affinität für Polyphosphat Me^{2+} an DyTP_2 binden, so daß keine ausreichende Bindung von Na^+ an den Komplex mehr zustande kommt. Schon geringe Konzentrationen von Mg^{2+} oder Ca^{2+} im Medium können das Verschiebungsreagens "vergiften" (Abb. 7-1b).

Bei pH-Werten unter 6 nimmt Δ_δ gleichfalls stark ab. Die Kurve $\Delta_\delta(\text{pH})$ (Chu et al. 1984, Fig. 2) entspricht der Titrationskurve $\delta(\text{pH})$ für Mg^{2+} -komplexiertes Triphosphat. Das läßt den Schluß zu, daß bei saurem pH die Affinität des Komplexes für Na^+ abnimmt, weil die infragekommenen Bindungen stärker durch Protonen besetzt sind, oder daß der Komplex selbst instabil wird.

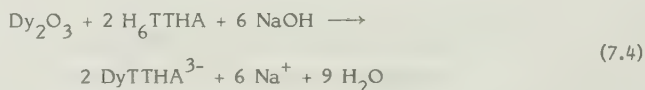
7.3.3 Herstellung und Eigenschaften von DyTTHA

Chu et al. (1984) haben die Verwendung von TTHA als Komplexbildner vorgeschlagen, um der pH-Abhängigkeit der Verschiebung und der Beeinflussung durch zweiwertige Ionen aus dem Wege zu gehen. Außerdem ist eine Beeinflussung des Stoffwechsels durch TP nicht auszuschließen, da eine Reihe von Mikroorganismen TP aufnimmt.

Der Komplex wird aus DyCl_3 und H_6TTHA gebildet:



Die Stammlösung enthält also pro Dy^{3+} sechs mol Na^+ . Die von Chu et al. vorgeschlagene Erzeugung einer Stammlösung unter Verwendung von Dy_2O_3 statt DyCl_3 nach



zur Verminderung der Menge an Gegenkationen erwies sich als nicht praktikabel, da Dy_2O_3 nur schwer in Lösung geht. Auch bei Erhitzen verläuft diese Reaktion sehr langsam.

DyTTHA ist gegen zweiwertige Kationen weit weniger empfindlich als DyTP_2 . Allerdings werden grundsätzlich nur kleinere Werte von Δ_δ erreicht. Die Verschiebung des Na-Signals erfolgt zu höheren Frequenzen.

7.4. Die Anwendungen von Verschiebungsreagenzien bei *Platymonas*

7.4.1 Messungen mit DyTP_2

Spektren von *Platymonas* wurden bei 95,26 MHz in 10 mm Röhrchen aufgenommen. Die verwendeten hohen Zelldichten verhinderten eine Begasung der Suspensionen, so daß die Spektren jeweils den anaeroben Zustand repräsentieren. Die Sedimentation der Zellen erfolgte während der verhältnismäßig kurzen Aufnahmedauer einzelner Spektren noch nicht.

Die Verwendung von DyTP_2 machte es zwingend erforderlich, auf zweiwertige Kationen im Meßmedium zu verzichten. Aber auch nach mehrmaligem Waschen der Zellen mit 0,4 M NaCl führte die Zugabe von DyTP_2 nicht zu einer Verschiebung des extrazellulären ^{23}Na -Signals. Möglicherweise verbleibt Mg^{2+} oder Ca^{2+} an der Theca, das erst durch das TP_1 mit seiner hohen Affinität für Me^{2+} von dort entfernt wird und das Verschiebungsreagens "vergiftet".

Die Zellsuspension wurde daher kurzfristig (3 min) mit NaCl + 10 mM EDTA gewaschen. Hohe EDTA-Konzentrationen greifen zwar die Plasmamembran an, ändern aber nicht die Energieversorgung der Zellen. Außerdem ist zu vermuten, daß die Einwirkung von 10 mM EDTA größenordnungsmäßig der Einwirkung des Verschiebungsreagens auf die Zellmembran entspricht, wenn die mögliche Destabilisierung der Membran durch Entzug von Ca^{2+} betrachtet wird.

Nach der Resuspendierung der Zellen im Medium mit 8 mM DyTP_2 ($[\text{Na}^+] = 400 \text{ mM}$) ergab sich das Spektrum in Abbildung 7-3. Intra- und extrazelluläres Na^+ sind deutlich getrennt. Das Na^+ -Signal des Mediums ist um 4,3 ppm gegen das intrazelluläre Signal verschoben. Die Linienbreite von 1 ppm des extra- und des intrazellulären Signals sind vor allem auf mikroskopische Feldinhomogenitäten durch Suszeptibilitätsdifferenzen über die Zellmembran, verbunden mit der nicht kugelsymmetrischen Form der Zellen zurückzuführen (siehe Kap. 4.1.3.4).

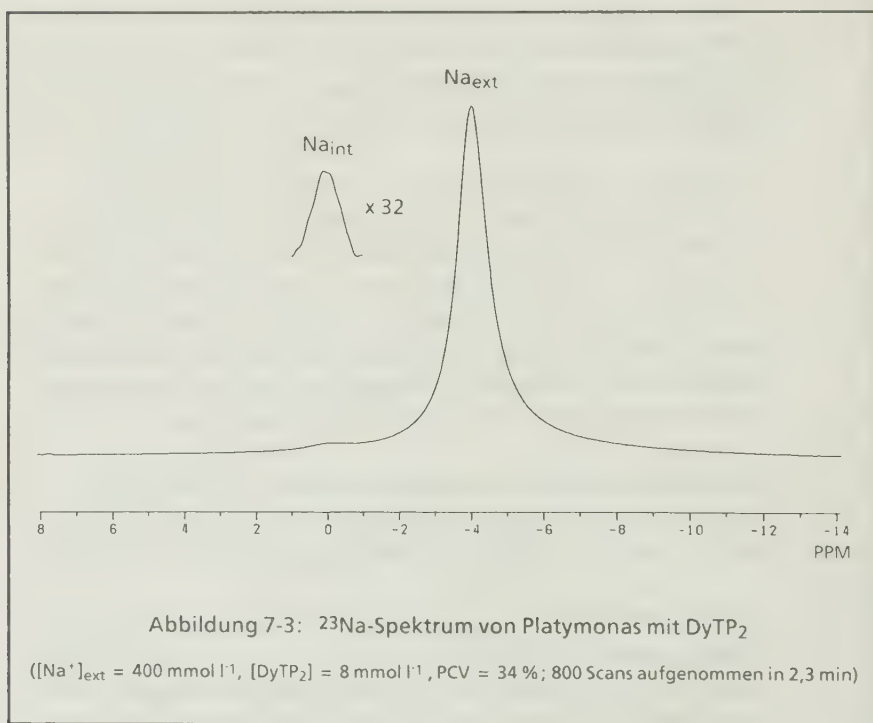
Die Konzentration des intrazellulären Natriums ist berechenbar nach

$$[\text{Na}^+]_{\text{int}} = \frac{I_{\text{int}}}{I_{\text{ext}}} \frac{V_{\text{ext}}}{V_{\text{int}}} [\text{Na}^+]_{\text{ext}} K_s \quad (7.5)$$

($I \hat{=}$ Signalintensität, $V_{\text{ext/int}} \hat{=}$ Volumen des extrazellulären bzw. intrazellulären Raumes, $K_s \hat{=}$ Korrekturfaktor, der die nur teilweise Sichtbarkeit des intrazellulären Na^+ berücksichtigt: 1 oder 2,5, siehe Diskussion unten.)

$[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ ist die Konzentration im Meßmedium, die im allgemeinen bekannt ist. Wenn aber zum Beispiel nach Überführen zentrifugierter Zellen in ein Medium mit geänderter Salinität die resultierende Konzentration nicht bekannt ist, kann statt I_{ext} , V_{ext} und $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ auch I_{total} ,

V_{total} und $[\text{Na}^+]_{\text{total}}$ eingesetzt werden. $[\text{Na}^+]_{\text{total}}$ wird bestimmt, indem die gesamte Signalfäche vor und nach dem Einbringen einer Standardkapillare gemessen wird. V_{int} muß aus dem PCV ermittelt werden. Eine genaue Bestimmung des Verhältnisses $I_{\text{int}}/I_{\text{ext}}$ durch einfaches Integrieren über beide Signale setzt voraus, daß der auf den Fuß des jeweils anderen Signals entfallende Flächenanteil des Integrals vernachlässigbar ist. Das ist bei Experimenten mit *Platymonas* nicht der Fall. Der relative Anteil beider Signale wird daher durch Anpassung zweier Lorentzlinien an das Spektrum mit Hilfe des Programmes "GLINFIT" (Bruker 1986) ermittelt.



Für die Zellen von Abbildung 7-3 lag das intrazelluläre Partialvolumen bei 27 %, $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ bei 400 mmol l^{-1} und $I_{\text{int}}/I_{\text{ext}}$ bei $(1,9 \pm 0,5) : 100$. Damit erhält man für $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ $21 \pm 5 \text{ mmol l}^{-1}$ Zellvolumen, zunächst ohne Berücksichtigung einer unvollständigen Sichtbarkeit, das heißt mit

$K_s = 1$. Der angegebene Fehler bezieht sich auf die Reproduzierbarkeit von $I_{\text{int}}/I_{\text{ext}}$ bei verschiedenen Spektrenanpassungen: wenn I_{int} klein gegen I_{ext} ist, hängt der ermittelte Quotient stark von der gewählten, manuell eingestellten und visuell optimierten Phasen- und Basislinienkorrektur des Spektrums ab.

Weitere Spektren, die im Abstand von 11,5 min aufgenommen wurden, ergaben gleiche Werte für $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$. $\Delta\delta$ ging jedoch kontinuierlich zurück. Nach ~ 50 min lag $\Delta(\text{Na}^+_{\text{ext}})$ nur noch bei $-2,0$ ppm (bezogen auf Na^+_{int}), so daß weitere Messungen an derselben Suspension die Bestimmung von Na^+_{int} nicht mehr erlaubten, da sein Signal zu nahe an das breite Signal von Na^+_{ext} heranrückte.

Ein ^{31}P -Kontrollspektrum des Mediums (ohne Zellen) zeigt Abbildung 7-4. Das Medium enthält vor der Aufnahme von Zellen neben dem Verschiebungsreagens kein weiteres Phosphat (Abb. 7-4a). Während der Messung hat die Konzentration von DyTP_2 zugunsten von P_i abgenommen. Gleichzeitig ist der pH-Wert des Mediums von 8 zu Beginn der Messung auf 6 gesunken (Abb. 7-4b).

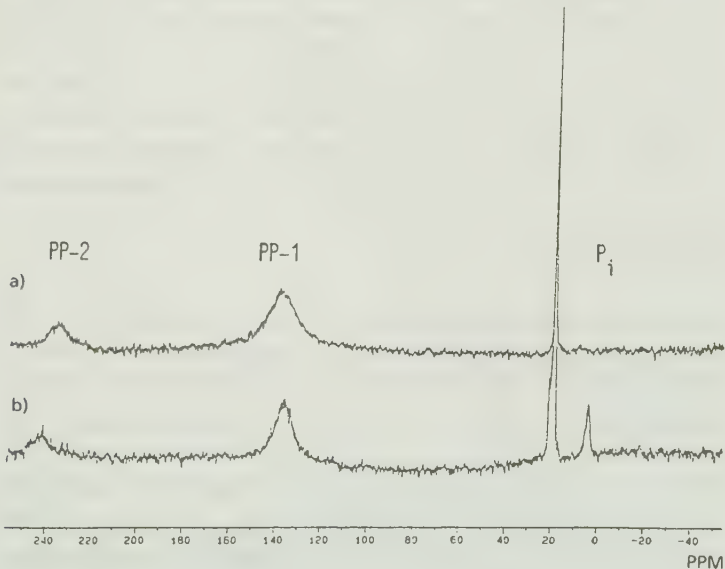


Abbildung 7-4: DyTP_2 -haltiges Medium vor (a) und nach (b) der Messung (^{31}P -Spektrum)

Dieser Effekt wird von den Zellen verursacht (vergleiche Abb 6-1). In Abwesenheit der Zellen ist das Verschiebungsreagens über einen langen Zeitraum (Wochen) stabil.

Das im Verlauf der Hydrolyse von TP zwangsläufig freigesetzte Dy^{3+} bewirkte keine signifikanten Veränderungen der (anaeroben) ^{31}P -Spektren von Zellsuspensionen.

7.4.2 Messungen mit DyTTHA

Die Verwendung von DyTTHA erlaubt, Zellen ohne vorheriges Waschen mit einer EDTA-haltigen Lösung zu untersuchen. Wegen der fehlenden Kenntnisse über biologische Wirkungen von TTHA ist es allerdings zweifelhaft, ob dies angesichts der nachfolgenden Einwirkungen eines TTHA-haltigen Komplexes von Bedeutung ist.

Wegen der geringen Verschiebungswirkung ist bei normalen Na^+ -Konzentrationen im Medium kein ausreichendes $\Delta\delta$ zur Auswertung des intrazellulären Signals zu erzielen. Eine Reduzierung von $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ auf 55 mmol l^{-1} unter Beibehaltung einer Osmolarität von $800 \text{ mosmol kg}^{-1}$ durch Zufügen von Sorbit zum Medium ermöglichte mit 9 mmol l^{-1} DyTTHA die Aufnahme von Spektren wie in Abbildung 7-5: mit $I_{\text{int}}/I_{\text{ext}} = 0,17$ und $V_{\text{int}} = 29,5 \%$ liegt $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ bei 22 mmol l^{-1} . Untersuchungen einer verdünnten Suspension derselben Zellen (Zellvolumen (22 %)) bei sonst gleichen Bedingungen sowie bei einer weiteren Verringerung von $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ auf 25 mmol l^{-1} ($[\text{SR}] = 3,2 \text{ mmol l}^{-1}$, $V_{\text{int}} = 13 \%$) ergaben ähnliche Werte von 26 mmol l^{-1} beziehungsweise 21 mmol l^{-1} für $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$, bezogen auf das Zellvolumen, bei $K_s = 1$.

Die Signale von Spektren, die unter Verwendung von DyTTHA als Verschiebungsreagens aufgenommen wurden, veränderten im Gegensatz zu den Spektren mit DyTP_2 ihre Lage im Verlaufe der Messungen nicht signifikant.

Abbildung 7-6 zeigt Spektren, die nach mehrmaligem Waschen der Zellen in $0,7 \text{ M}$ Sorbit bei noch niedrigerem $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ mit DyTTHA (12 mmol l^{-1}) aufgenommen worden sind. Um $[\text{Na}^+]$ im Verschiebungsreagens zu vermindern, wurde beim Ansetzen der Stammlösung nach Gleichung (7.3)

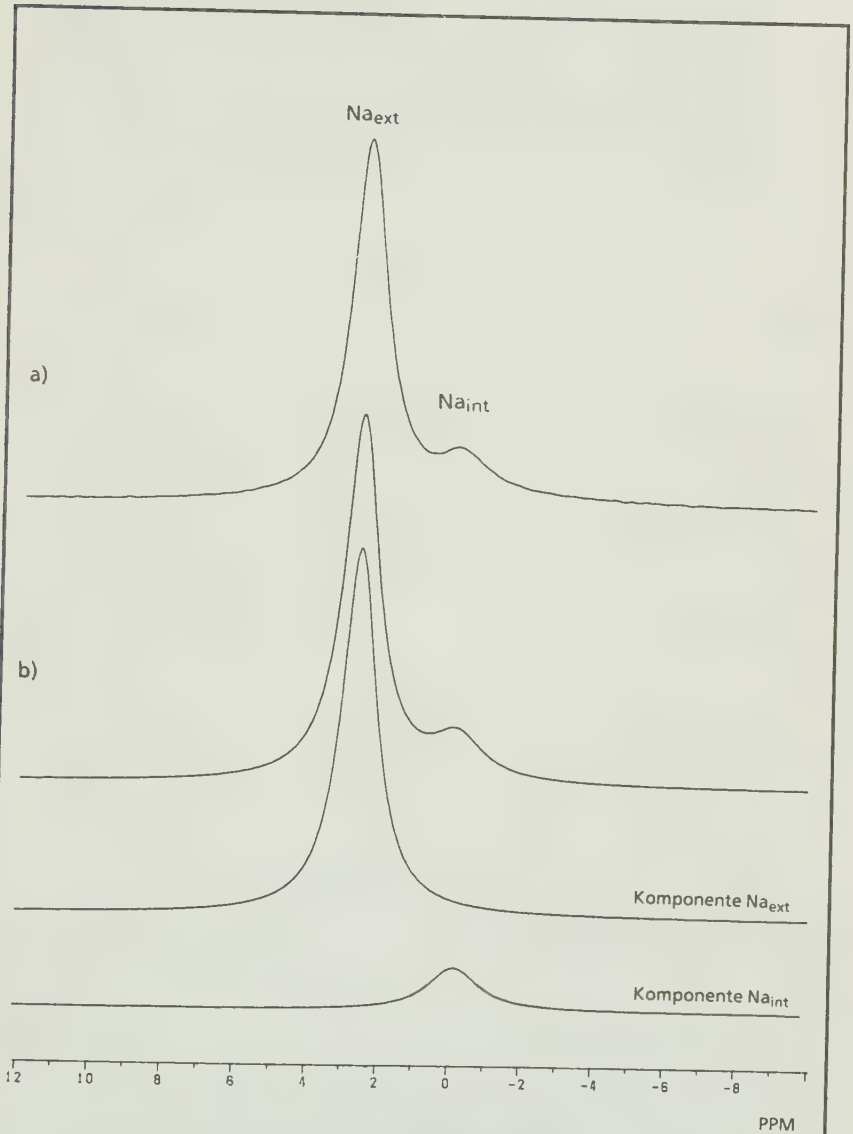


Abbildung 7-5: ^{23}Na -Spektrum von *Platymonas* mit DyTTHA

a) Spektrum von Zellen (PCV = 36,9%) in Sorbitmedium mit $[\text{Na}^+]_{\text{ext}} = 55 \text{ mmol l}^{-1}$ und $[\text{SR}] = 9 \text{ mmol l}^{-1}$; 4100 Scans aufgenommen in 32 min; b) Anpassung des Spektrums mit Hilfe des Simulationsprogrammes GLINFIT durch zwei Lorentzlinien

mit KOH statt NaOH neutralisiert. In Abbildung 7-6a ist $[\text{Na}^+]_{\text{total}} = 4,5 \text{ mmol l}^{-1}$. Davon entfallen 74,6 % auf den extrazellulären Bereich, 25,4 % der Signalintensität entfallen auf die Schulter, die intrazelluläres Na^+ darstellt. Das Partialvolumen der Zellen betrug 27,3 %, daraus ergibt sich nach Gleichung (7.5) $[\text{Na}^+]_{\text{ext}} = 4,6 \text{ mmol l}^{-1}$ und $[\text{Na}^+]_{\text{int}} = 4,2 \text{ mmol l}^{-1}$.

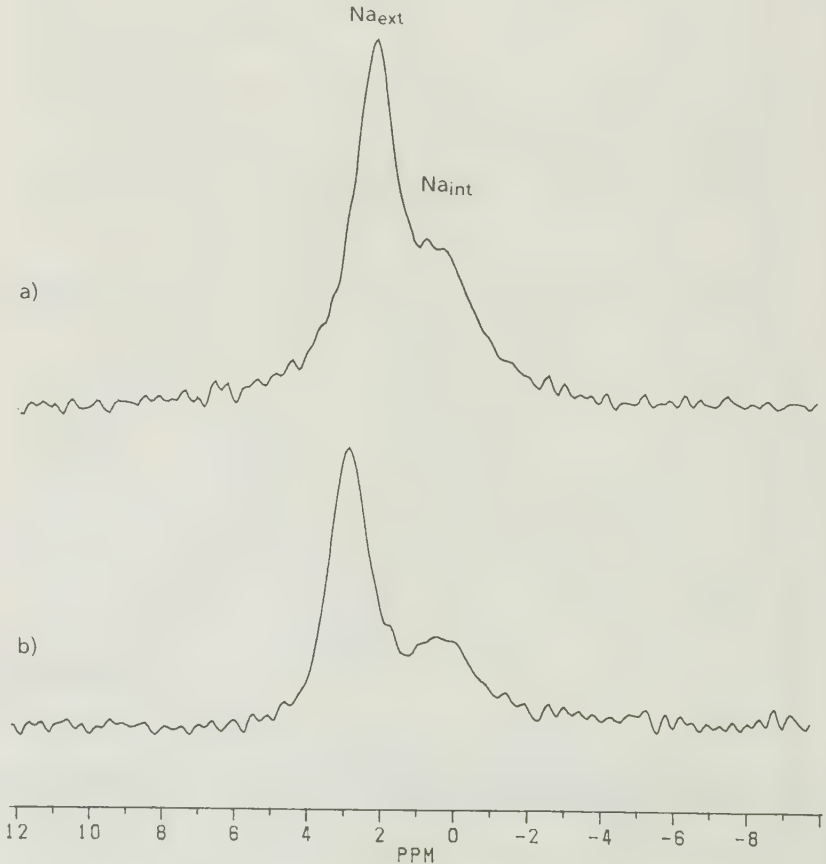


Abbildung 7-6: ^{23}Na -Spektrum von *Platymonas* mit DyTTHA in K^+ -haltigem Medium

a) Spektrum von Zellen (PCV = 34,1%) in $0,7 \text{ mol l}^{-1}$ Sorbit mit $[\text{SR}]_{\text{ext}} = 12 \text{ mmol l}^{-1}$, $[\text{K}^+]_{\text{ext}} = 72 \text{ mmol l}^{-1}$, $[\text{Na}^+]_{\text{total}} = 4,5 \text{ mmol l}^{-1}$

b) Spektrum derselben Zellen 2 h später in frischem Medium: PCV = 29,1%, $[\text{SR}]_{\text{ext}} = 12 \text{ mmol l}^{-1}$, $[\text{K}^+]_{\text{ext}} = 72 \text{ mmol l}^{-1}$, $[\text{Na}^+]_{\text{total}} = 3,2 \text{ mmol l}^{-1}$

Eine Wiederholung der Messung an denselben Zellen nach 2 h mit frischem Verschiebungsreagens ergibt wiederum $[\text{Na}^+]_{\text{int}} = 4,1 \text{ mmol l}^{-1}$, berechnet aus $[\text{Na}^+]_{\text{total}} = 3,25 \text{ mmol l}^{-1}$, $V_{\text{int}} = 23,3 \%$, $I_{\text{int}}/I_{\text{ext}} = 41,7 : 100$; $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ ist dabei $3,0 \text{ mmol l}^{-1}$ (Abb. 7-6b). Die geringere Na^+ -Konzentration in den Zellen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß sich - im Gegensatz zu den anderen Experimenten - als Gegenion zum Komplexbildner TTHA etwa 72 mM K^+ im Medium befanden (siehe Diskussion).

7.5 Diskussion: Ergebnisse und Aussichten der ^{23}Na -Spektroskopie an marinen Algen

Die erzielten Ergebnisse zeigen, daß die Untersuchung von Na^+_{int} unter Verwendung von Verschiebungsreagenzien grundsätzlich auch bei marinen Organismen möglich ist, auch wenn vorteilhaftere Reagenzien wünschenswert wären. Sie sollten eine große Verschiebungswirkung (wie DyTP_2) mit einer geringeren Affinität für zweiwertige Kationen (wie DyTTHA) verbinden. Eine extrazelluläre Metabolisierung sollte nicht stattfinden. Insbesondere unter aeroben Bedingungen ist dies ein Problem bei Verwendung von DyTP_2 .

DyTTHA wird offenbar nicht metabolisiert und verliert seine Verschiebungswirkung nicht. Seine Auswirkungen auf den Stoffwechsel sind aber weitgehend unbekannt. Darüberhinaus gibt es Anzeichen dafür, daß Lanthaniden-Komplexe von TTHA durch das Cytoplasma hindurch in Vakuolen transportiert werden, wo der Komplex aufgrund des niedrigeren pH zerfällt (beobachtet an Maiswurzelspitzen: S. Ratkowitz, priv. Mitteilung). Nähere Informationen über die Wirkungen der Reagenzien vor allem auf die Zellmembran und auf Prozesse in der Zellmembran sind vor allem dann notwendig, wenn Na^+ -Transportprozesse über die Membran quantitativ untersucht werden sollen.

Der Effekt von Dy^{3+} , das bei Hydrolyse des Komplexbildners im Medium freigesetzt wird, dürfte eher als gering einzuschätzen sein. ^{31}P -Kontrollspektren der (anaeroben) Zellsuspensionen vor und nach Messungen mit DyTP_2 zeigten keine signifikanten Änderungen des Phosphatspektrums. In vitro wurde festgestellt, daß Dy^{3+} an langkettiges polyP komplexiert, wodurch das Signal der Mittelgruppen verschwindet (ein Signal Dy^{3+} -komplexierten polyP konnte - anders als bei TP - im unter-

suchten Bereich zwischen +300 ppm und -100 ppm nicht entdeckt werden). In die Zelle eingedrungenes Dy^{3+} würde daher vermutlich zu einem großen Teil an polyP komplexieren, wodurch dessen Signal verkleinert werden würde. Das konnte in ^{31}P -Kontrollspektren nicht festgestellt werden; Dy^{3+} kann allenfalls in kleinen Konzentrationen in das Cytoplasma gelangt sein. Freies Dy^{3+} im Cytoplasma wäre allerdings toxisch für die Zelle.

Das intrazellulär sichtbare Natrium dürfte fast ausschließlich als Na^+ -Ion vorliegen. Nicht abschließend geklärt ist die Frage, ob intrazelluläres Na^+ im gleichen Maße sichtbar ist wie extrazelluläres Na^+ . Bisherige Untersuchungen an anderen Zellsystemen zeigen, daß intrazelluläres Na^+ in Erythrozyten und in *Dyctiostelium* offenbar zu 100 % sichtbar ist (vergleiche die in der Einführung zitierten Arbeiten), während in anderen Zellen - vor allem bei Hefe und *E. coli* sowie einer Reihe von Geweben (Civan und Shporer 1978) Na^+_{int} nur zu etwa 40 % sichtbar ist. Der Anteil von 40 % entspricht dem langsam transversal relaxierenden Anteil des Signals, das heißt dem schmalen Anteil der Linie (siehe Gleichung (7.2)). Es wird angenommen, daß der schnell relaxierende 60 %-Anteil der Linie des intrazellulären Natriums so breit geworden ist, daß er von der Grundlinie nicht mehr unterscheidbar ist und daher nach der grundsätzlich notwendigen Basislinienkorrektur bei der Ermittlung der Signalfäche nicht berücksichtigt werden kann. Als möglicher Grund für diese starke Verbreiterung wird angenommen, daß die mittlere Korrelationszeit τ_c groß wird, weil das Natrium zeitweilig an größere Moleküle gebunden ist, die im viskosen Cytoplasma wenig mobil sind. Außerdem ist bekannt, daß die transversale Relaxation auch durch Anwesenheit von Polyanionen beschleunigt wird (Civan und Shporer 1978). Vermutlich enthalten Zellen von *Platymonas* neben polyP auch noch andere, organische Polyanionen, so daß mit einer schnellen transversalen Relaxation für 60 % des Signals zu rechnen ist. Die gemessenen Werte für $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ von 20 bis 25 mmol l^{-1} müssen deshalb wahrscheinlich auch bei *Platymonas* mit einem K_s von 2,5 multipliziert werden, so daß die tatsächlichen Konzentrationen bei 50 bis 60 mmol l^{-1} liegen. Diese Konzentrationen sind auf das totale Zellvolumen bezogen; wenn Na^+ sich in der wässrigen Phase befindet, muß seine Menge auf das osmotische Volumen bezogen werden, das heißt, $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ liegt um einen weiteren Faktor 2,75 höher, bei 140 mmol l^{-1} bis 170 mmol l^{-1} . Für die aus Abbildung 7-6 ermittelten Konzentrationen von etwa 4 mmol l^{-1} (für $K_s =$

1) gilt entsprechend $[\text{Na}^+]_{\text{int}} = 10 \text{ mmol l}^{-1}$ Zellvolumen beziehungsweise $[\text{Na}^+]_{\text{int}} = 27,5 \text{ mmol l}^{-1}$ osmotisches Volumen, für $K_s = 2,5$.

$[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ ist an Platymonas mit Flammenphotometrie nach Waschen der Zellen mit einer isotonen Saccharoselösung (Kirst 1977a) und mit Atom-Absorptions-Spektroskopie nach Waschen der Zellen in einer isosmotischen Lösung von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Dickson und Kirst 1986) bestimmt worden. Während im ersteren Fall für Zellen, die im Medium mit $0,4 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl gewachsen sind, $[\text{Na}^+]_{\text{int}} = 43 \pm 7 \text{ mmol l}^{-1}$ Zellvolumen gemessen worden ist, ergab sich im anderen Fall für Zellen aus Medien mit $0,3$ bis $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl $[\text{Na}^+]_{\text{int}} = 15 \pm 2 \text{ mmol l}^{-1}$ Zellvolumen. Die Unterschiede beider Messungen werden auf die unterschiedlichen Waschmedien zurückgeführt. Das Ergebnis nach Waschen mit Saccharose kommt den mit ^{23}Na -Spektroskopie in NaCl und in Sorbit/ Na^+ -haltigen Medien gemessenen Werten nahe, der nach Waschen mit $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ gemessene Wert entspricht der Konzentration in Sorbit/ K^+ -Medium.

Da die Zellen für alle Na-Spektren unter anaeroben Bedingungen gemessen wurden, kann die Ursache für die beobachteten unterschiedlichen Natriumkonzentrationen nicht in Leistungsunterschieden liegen. Die geringere Konzentration in der Probe von Abbildung 7-6 könnte vielmehr auf einen direkten oder indirekten Antiport von Na^+ und K^+ hinweisen. Dann wäre für die Einstellung einer Na^+ -Konzentrationsdifferenz durch Natriumexport außer der verfügbaren Leistung auch die Menge von Kaliumionen im Medium ein begrenzender Faktor.

Eine andere Interpretation könnte sich an die Deutung der unterschiedlichen Meßwerte nach Waschen mit Saccharose und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ anschließen. Dickson und Kirst (1986) vermuten, daß durch die Saccharoselösung nicht alles an der Zelle haftende Na^+ entfernt wird. Insbesondere zwischen Plasmalemma und Theca könne ein Rest NaCl-haltigen Mediums verbleiben.

Es ist möglich, daß in diesem Raum Na^+ verbleibt, dem sich die großmolekuligen Verschiebungsreagenzien nicht ausreichend nähern können. Im K^+ -haltigen Medium mit seinem niedrigen Na^+ -Gehalt könnten dagegen auch diese eigentlich extrazellulären Na^+ -Ionen durch K^+ -Ionen verdrängt worden sein. Allerdings müßten erhebliche Na^+ -Konzentrationen im periplasmatischen Volumen, das auf jeden Fall klein gegen das Zell-

volumen ist, angenommen werden, um die gemessene Konzentrationsdifferenz zu erklären.

Analog zu den Berechnungen in Kapitel 5. kann auch der Leistungsbedarf für die Aufrechterhaltung einer Na^+ -Konzentrationsdifferenz über die Plasmamembran abgeschätzt werden. Bei einer wiederum angenommenen Potentialdifferenz von $-0,1$ V über die Membran (innen negativ) besteht ein elektrochemisches Potential, das einen Natriumeinstrom in die Zelle fördert.

In Seewasser mit $[\text{Na}^+]_{\text{ext}} = 360 \text{ mmol l}^{-1}$ gilt nach Gleichung (5.3) $\Delta\mu \approx 16.000 \text{ J mol}^{-1}$ (für $[\text{Na}^+]_{\text{int}} \approx 27,5 \text{ mmol l}^{-1}$) bis $12.000 \text{ J mol}^{-1}$ (für $[\text{Na}^+]_{\text{int}} = 170 \text{ mmol l}^{-1}$). Der Natriumfluß in die Zelle hängt ähnlich wie der Protonenimport im wesentlichen nur von $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ ab. Die Membranpermeabilität für Na^+ liegt bei $2 \cdot 10^{-12} \text{ m s}^{-1}$ (Raven 1982). Nach Gleichung (5.3) ist der Natriumfluß $J_{\text{Na}^+} = 3,2 \cdot 10^{-9} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, also für eine typische Zelle mit der Oberfläche $2,8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2$ etwa $J_{\text{Na}^+}^Z = 9,0 \cdot 10^{-19} \text{ mol s}^{-1}$. Dann liegt die minimal erforderliche Pumpleistung P_{Na^+} zur Aufrechterhaltung einer Na^+ -Konzentrationsdifferenz nach Gleichung (5.10) bei $1 \cdot 10^{-14} \text{ W}$ bis $1,4 \cdot 10^{-14} \text{ W}$, je nach $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$. Bei Verwendung des Verschiebungsreagens DyTTHA war $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ auf 55 mmol l^{-1} reduziert. Die unter diesen Bedingungen erforderliche Pumpleistung liegt unter $1 \cdot 10^{-15} \text{ W}$. In beiden Fällen liegt P_{Na^+} zwar unter der verfügbaren Glykoseleistung, sie erreicht aber im Seewasser 20 bis 30 % davon. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß im Rahmen der Anpassung des Stoffwechsels an ein verringertes Leistungsangebot auch der Na^+ -Export aus der Zelle verringert wird, so daß die intrazelluläre Natriumkonzentration in ausschließlich glykolysierenden Zellen höher als die in atmenden Zellen liegt. Dies ist zum Beispiel bei *E. coli* mit ^{23}Na -Spektroskopie beobachtet worden (Castle et al. 1986).

Genaue Aussagen über Ionenflüsse und für den Na^+ -Export notwendige Pumpleistungen lassen sich - wie auch beim H^+/OH^- -Transport - nur bei einer genaueren Kenntnis des tatsächlichen Membranpotentials machen.

8. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit werden kernspinresonanzspektroskopische Untersuchungen dargestellt, die zur Fortentwicklung der Anwendung der NMR-Spektroskopie auf lebende Zellen beitragen sollen, insbesondere auf marine Algen.

Vier Bereiche bilden die Schwerpunkte der Arbeit:

- der Einfluß wird untersucht, den erhöhte Ionenkonzentrationen im Medium auf die NMR-Spektren ausüben, und es wird dargestellt, welche Informationen aus in vivo-Spektren von Zellsuspensionen gewonnen werden können;
- der Energiestoffwechsel glykolysierender, atmender und photosynthesisierender Zellen der euryhalinen Mikroalge *Platymonas subcodiformis* wird untersucht;
- der Stoffwechsel dieser Zellen wird in Abhängigkeit vom pH des Mediums untersucht, wobei besonders auf die Regulation des intrazellulären pH eingegangen wird;
- die ^{23}Na -NMR-Spektroskopie wird zur Bestimmung intrazellulärer Na^+ -Konzentrationen angewendet.

Die besonderen Bedingungen, die bei der Untersuchung von Zellen in salzhaltigen Medien herrschen, verschlechtern das Signal-Rausch-Verhältnis. Es nimmt mit dem Quadrat der elektrischen Leitfähigkeit der Probe ab. Große Probenvolumina vergrößern bei fester Leitfähigkeit das Signal-Rausch-Verhältnis, wodurch die notwendige Meßzeit abnimmt. Bei stark salzhaltigen Proben ist der Vorteil eines großen Probenvolumens gegenüber einem kleineren aber geringer als bei Proben in Süßwasserm Medien. Suszeptibilitätsunterschiede zwischen Zellinnerem und Medium können zu Linienverbreiterungen führen. Wenn die Unterschiede groß sind, sind Zellen mit speziellen Formen (kugelförmige oder parallel zum Magnetfeld orientierte stabförmige Zellen) vorteilhaft.

Die Alge *Platymonas subcordiformis* erlaubt im Seewassermedium die Aufnahme aussagefähiger ^{31}P -Spektren. Sie zeigen charakteristische Konzentrationsverhältnisse der Metaboliten und pH-Werte, die einen Rückschluß von den Spektren auf die Energieversorgung der Zellen erlauben. Algen, die ihre Energie ausschließlich aus Glykolyse beziehen, besitzen einen cytoplasmatischen pH um 7,1 - ablesbar an der chemischen Verschiebung des P_i -Signals - sowie einen hohen P_i - und einen niedrigen ATP-Gehalt. Der cytoplasmatische pH atmender Zellen ist um 0,4 oder etwas mehr Einheiten alkalischer, das P_i -Signal ist kleiner, das ATP-Signal größer, und ein deutlich ausgeprägtes Signal von PArg wird sichtbar. Die Spektren von Zellen, die zusätzlich belichtet werden, unterscheiden sich allenfalls geringfügig von denen atmender Zellen im Dunkeln. Die unterschiedlichen Spektren repräsentieren Stoffwechselzustände, in denen verschiedene Energiebeträge intrazellulär vom Adenylatsystem transportiert werden können; diese Energiebeträge lassen sich abschätzen. Die ermittelten Konzentrationen von Nukleotiden und P_i ermöglichen die Berechnung des Phosphorylierungspotentials.

Die intrazellulären pH-Werte und die typische pH-Differenz zwischen glykolysierenden und atmenden Zellen sind weitgehend stabil, wenn die externen pH-Werte zwischen $\text{pH}_{\text{ext}} 6$ und $\text{pH}_{\text{ext}} 12$ variieren. Unterhalb $\text{pH}_{\text{ext}} 6$ ist pH_{int} in anaeroben Zellen weniger stabil: bei $\text{pH}_{\text{ext}} 4$ ist pH_{int} um 0,6 Einheiten auf 6,4 abgesunken. In belüfteten Zellen bleibt pH_{int} bis $\text{pH}_{\text{ext}} 5$ stabil, um bei niedrigeren Werten schnell saurer zu werden und bei $\text{pH}_{\text{ext}} 3,6$ auf einen Wert unter 6 abzufallen. Bei pH_{ext} von 4 und darunter sind Spektren anaerober und belüfteter Zellen nicht mehr unterscheidbar. ATP und ADP geben keine Signale mehr. Bei Rückkehr zu höheren pH_{ext} nehmen die Spektren wieder ihre normalen Erscheinungsformen an. Auf alkalische Belastungen durch pH_{ext} über 11 reagieren nichtatmende Zellen mit der Hydrolyse von intrazellulärem polyP, wobei PP_i gebildet wird. In atmenden Zellen bleibt das polyP-Signal unbeeinflusst.

Der minimale Leistungsbedarf einer *Platymonas*-Zelle zur Stabilisierung des intrazellulären pH durch Pumpmechanismen wird in Abhängigkeit von pH_{ext} für verschiedene mögliche Membranpotentiale berechnet und mit den abgeschätzten Leistungen der Zellen bei alleiniger Glykolyse und bei Atmung verglichen. Der Vergleich zeigt, daß unterschiedliches Leistungsvermögen eine mögliche Erklärung des unterschiedlichen Ver-

haltens anaerober und atmender Algen bei Belastungen durch extreme pH-Werte des Mediums darstellt.

Untersuchungen des polyP-Signals unter verschiedenen Bedingungen zeigen, daß polyP in *Platymonas subcordiformis* im Gegensatz zu einigen anderen Mikroorganismen nicht außerhalb der Zellmembran lokalisiert ist. Messungen an gelösten Natriumsalzen langkettiger polyP ergeben Anhaltspunkte dafür, daß polyP im Zellinneren nicht gestreckt, sondern helikal gewunden vorliegt und außer mit Mg^{2+} und Ca^{2+} auch mit paramagnetischen Ionen wie Mn^{2+} komplexiert ist. Darüber hinaus zeigt sich, daß polyP-Ketten Komplexe mit Mg^{2+} in verschiedenen diskreten $\text{Mg}^{2+}/\text{PO}_3$ -Verhältnissen bilden, die sich durch die Konformation der polyP-Ketten voneinander unterscheiden. Die diskreten Konformationszustände sind hinreichend stabil, so daß unter geeigneten Meßbedingungen zwei unterschiedliche Zustände gleichzeitig in einer Probe beobachtet werden können.

Schließlich wird gezeigt, daß intrazelluläre Na^+ -Konzentrationen gemessen werden können, wenn dem Medium geeignete Verschiebungsreagenzien zugegeben werden. Die bei $[\text{Na}^+]_{\text{ext}} = 400 \text{ mmol l}^{-1}$ ermittelte intrazelluläre Konzentration von etwa 50 mmol l^{-1} (bezogen auf das Zellvolumen) ergibt sich auch bei Messungen bei verringertem $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ in isotonen Sorbitlösungen. Die Vor- und Nachteile der Reagenzien DyTP_2 und DyTTHA bei der Anwendung auf *Platymonas* werden dargestellt.

Literatur

- Abragam, A. 1961: The Principles of Nuclear Magnetism, Clarendon Press Oxford
- Adams, J. Q. 1966: Measurement of static paramagnetic susceptibility with high resolution proton NMR spectrometer, *Rev. Sci. Instr.* 37: 1099 - 1100
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. 1986: Molekularbiologie der Zelle, Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße
- Balschi, J. A., Cirillo, V. P., Springer, C. S. 1982: Direct high-resolution nuclear magnetic resonance studies of cation transport in vivo, *Biophys. J.* 38: 323 - 326
- Bárány, M., Glonek, T. 1984: Identification of diseased states by Phosphorus-31 NMR, in: Gorenstein, D. G. (Hg.): Phosphorus-31 NMR, Principles and Applications, pp 512 - 546, Academic Press Orlando, London
- Barrow, D., Jamieson, D. D., Norton, R. S. 1980: ^{31}P Nuclear-Magnetic-Resonance Studies of Energy Metabolism in Tissue from the Marine Invertebrate *Tapes watlingi*, *Eur. J. Biochem.* 103: 289 - 297
- Blumenstein, M., Raftery, M. A. 1972: ^{31}P and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Studies of Nicotinamide-Adenine Dinucleotide and Related Compounds, *Biochem.* 11 (9): 1643 - 1648
- Bock, K., Meyer, B., Vignon, M. 1980: Some consequences of high frequency in NMR spectrometers, *J. Mag. Res.* 38: 545 - 551
- Bomssel, J. L., Pradet, A. 1968: Study of adenosine-5'-mono-, di-, and triphosphates in plant tissues, IV. Regulation of the level of nucleotides, in vivo, by adenylate kinase: theoretical and experimental study, *Biochim. Biophys. Acta* 162: 230 - 242
- Boulanger, Y., Vinay, P., Desroches, M. 1985: Measurement of a wide range of intracellular sodium concentrations in erythrocytes by ^{23}Na nuclear magnetic resonance, *Biophys. J.* 47: 553 - 561
- Bozorth, R. M., Chapin, D. M. 1942: Demagnetizing factors of rods, *J. Appl. Phys.* 13: 320 - 326
- Bruker 1986: Programmpaket DISB86 (u.a. Bedienungsprogramm DISNMR) sowie ABACUS-Ergänzungsprogramm GLINFIT, Vers. 870401 (Bain, A. D. (Progr.)), Bruker Karlsruhe, Spectrospin Zürich
- Burt, C. T., Glonek, T., Bárány, M. 1976: Analysis of Phosphate Metabolites, the Intracellular pH, and the State of Adenosine Triphosphate in Intact Muscle by Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance, *J. Biol. Chem.* 251: 2584 - 2591
- Burt, C. T., Cohen, S. M., Bárány, M. 1979: Analysis of Intact Tissue with ^{31}P NMR, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 8: 1 - 25
- Busa, W. B., Nuccitelli, R. 1984: Metabolic regulation via intracellular pH, *Am. J. Physiol.* 246: R409 - R438
- Castle, A. M., Macnab, R. M., Shulman, R. G. 1986: Measurement of intracellular sodium concentration and sodium transport in *E. coli* by ^{23}Na nuclear magnetic resonance, *J. Biol. Chem.* 261 (7): 3288 - 3294
- Chapman, A. G., Atkinson, D. E. 1977: Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlations with biological activity in bacteria and yeast, *Adv. in Microbial Physiol.* 15: 253 - 306

- Chu, S. C., Pike, M. M., Fossel, E. T., Smith, T. W., Balschi, J. A., Springer, C. S. 1984: Aqueous shift reagents for high-resolution cationic nuclear magnetic resonance. III.: $\text{Dy}(\text{TTHA})^{3-}$, $\text{Tm}(\text{TTHA})^{3-}$ and $\text{Tm}(\text{PPP})_2^{7-}$, J. Mag. Res. 56: 33 - 47
- Civan, M. M., Shporer, M. 1978: NMR of Sodium-23 and Potassium-39 in Biological Systems, in: Berliner, L. J., Reuben J. (Hg.): Biological Magnetic resonance, pp 1 - 32, Plenum New York, London
- Cowan, B. E., Sze, D. Y., Mai, M. T., Jardetzky, O. 1985: Measurement of the sodium membrane potential by NMR, FEBS Lett. 184 (1): 130 - 133
- CRC Handbook 1980: Weast, R. C., Astle, M. S. (Hg.): CRC Handbook of Chemistry and Physics, pp D229 - D276, 60. Aufl., CRC Press Boca Raton, Florida
- Davis, D. D. 1973: Metabolic Control in Higher Plants, in: Milborrow, B. V. (Hg.): Biosynthesis and its control in plants, pp 1 - 20, Academic Press London, New York
- Dawson, P. S. S., MacDonald, J. C. 1987: Changes in phosphorus magnetic resonance spectra during the cell cycle of phosphorus limited phased culture of *Candida utilis*, FEMS Microbiol. Lett. 43: 57 - 60
- Daugaard, P., Jakobsen, H. J., Garber, A. R., Ellis, P. D. 1981: A simple method for NMR probe tuning and some consequences of improper probe tuning, J. Mag. Res. 44: 224 - 227
- Degani, H., Sussman, I., Peschek, G. A., Avron, M. 1985: ^{13}C - and ^1H -NMR studies of osmoregulation in *Dunaliella*, Biochim. Biophys. Acta 846: 313 - 323
- Dickinson, W. 1951: The Time Average Magnetic Field at the Nucleus in Nuclear Magnetic Resonance Experiments, Phys. Rev. 81 (9): 717 - 731
- Dickson, D. M. J., Kirst, G. O. 1986: The role of β -dimethylsulphoniopropionate, glycine betaine, and homarine in the osmoacclimation of *Platymonas subcordiformis*, Planta 167: 536 - 543
- Elgavish, A., Elgavish, G. A., Halmann, M., Berman, T., Shomer, I. 1980: Intracellular Phosphorus Pools in Intact Algal Cells - ^{31}P NMR and Transmission Electron Microscopy Studies, FEBS Lett. 117 (1): 137 - 142
- Ernst, R. R., Anderson, W. A. 1966: Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance, Rev. Sci. Instr. 37 (1): 93 - 102
- Findly, R. C., Gillies, R. J., Shulman, R. G. 1983: In vivo Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Reveals Lowered ATP During Heat Shock of *Tetrahymena*, Science 219: 1223 - 1225
- Fossarello, M., Orzalessi, N., Corongiu, F. P., Biagini, S., Casu, M., Lai, A. 1985: ^{23}Na NMR investigation of human lenses from patients with cataracts, FEBS Lett. 184 (2): 245 - 248
- Foyer, C., Walker, D., Spencer, C., Mann, B. 1982: Observations on the phosphate status and intracellular pH of intact cells, protoplasts and chloroplasts from photosynthetic tissue using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance, Biochem. J. 202: 429 - 434
- Friedman, M. H. 1986: Principles and Models of Biological Transport, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- Gadian, D. G. 1982: Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems, Clarendon Press Oxford
- Gadian, D. G., Robinson, F. N. H. 1979: Radiofrequency Losses in NMR Experiments on Electrically Conducting Samples, J. Mag. Res. 34: 449 - 455

- Gadian, D. G., Radda, G. K., Richards, R. E., Seeley, P. I. 1979: ^{31}P NMR in Living Tissue: The Road from a Promising to an Important Tool in Biology, in: Shulman, R. G. (Hg.): Biological Applications of Magnetic Resonance, pp 463 - 486, 526 - 535, Academic Press New York
- Gard, J. K., Ackerman, J. J. H. 1983: A ^{31}P NMR External Reference for Intact Biological Systems, J. Mag. Res. 51: 124 - 127
- Gerasimowicz, W. V., Tu, S. I., Pfeffer, P. E. 1986: Energy facilitated Na^+ uptake in excised corn roots via ^{31}P and ^{23}Na NMR, Plant Physiol. 81: 925 - 928
- Gibson, A. A. V., Kirk, W. P. 1984: Precision measurement of nuclear susceptibility by pulsed NMR, Rev. Sci. Instr. 55 (7): 1111 - 1115
- Gillies, R. J., Ugurbil, K., den Hollander, J. A., Shulman, R. G. 1981: ^{31}P NMR studies of intracellular pH and phosphate metabolism during cell division cycle of *Saccharomyces cerevisiae*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2125 - 2129
- Gimmler, H., Kugel, H., Leibfritz, D., Mayer, A. 1988: The cytoplasmic pH of *Dunaliella parva* as monitored by in vivo ^{31}P -NMR-spectroscopy and the DMO-technique, J. Plant Physiol., zur Veröffentl. eingereicht
- Glonek, T. 1978: Effect of magnesium complexation on the ^{31}P middle-group chemical shifts of chain and ring phosphates, Phosphorus and Sulfur 4: 235 - 238
- Glonek, T., Lunde, M., Mudgett, M., Myers, T. 1971: Studies of Biological Polyphosphate Through the Use of Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance, Arch. Biochem. Biophys. 142: 508 - 513
- Glonek, T., Kleps, R. A., Griffith, E. J., Myers, T. C. 1975a: Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies on condensed phosphates. I. Some factors influencing the phosphate middle group chemical shift, Phosphorus 5: 157 - 164
- Glonek, T., Costello, A. J. R., Myers, T. C., van Wazer, J. R. 1975b: Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies on condensed phosphates. III. Polyphosphate spectra, J. Phys. Chem. 79 (12): 1214 - 1218
- Gmelin 1965: Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie Nr. 16 Teil C 8. Aufl., Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße
- Goldfarb, V., Sanders, D., Gradmann, D. 1984a: Phosphate Relations of Acetabularia: Phosphate Pools, Adenylate Phosphates and ^{32}P Influx Kinetics, J. Exp. Bot. 35 (154): 626 - 644
- Goldfarb, V., Sanders, D., Gradmann, D. 1984b: Reversal of Electrogenic Cl^- Pump in *Acetabularia* Increases Level and ^{32}P Labelling of ATP, J. Exp. Bot. 35 N. 154, 645 - 658
- Goller, M., Hampp, R., Ziegler, H. 1982: Regulation of cytosolic adenylate ratio as determined by rapid fractionation of mesophyll protoplasts of oat, Planta 156: 255 - 263
- Gorenstein, D. G. 1984: Phosphorus-31 chemical shifts: principles and empirical observations, in: Gorenstein, D. G. (Hg.): Phosphorus-31 NMR, Principles and Applications, pp 7 - 36, Academic Press Orlando, London
- Gupta, R. K., Gupta, P. 1982: Direct observation of resolved resonances from intra- and extracellular sodium-23 ions in NMR studies of intact cells and tissues using Dysprosium(III)tripolyphosphate as paramagnetic shift reagent, J. Mag. Res. 47: 344 - 350
- Gutknecht, J. 1987: Proton/hydroxide conductance and permeability through phospholipid bilayer membranes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (18): 6443 - 6446

- Harold, F. M. 1966: Inorganic Polyphosphates in Biology: Structure, Metabolism, and Function, *Bacteriol. Rev.* 30 (1): 772 - 794
- Hayes, C. E., Edelstein, W. A., Schenk, J. E., Mueller, O. M., Eash, M. 1985: An efficient, highly homogeneous radiofrequency coil for whole-body NMR imaging at 1.5 T, *J. Mag. Res.* 63: 622 - 628
- Heldt, H. W. 1976: Metabolite transport in intact spinach chloroplasts in: Barber J. (Hg.): *The intact chloroplast*, pp 215 - 234, Elsevier/North-Holland Amsterdam, New York, Oxford
- Hill, H. D. W., Richards, R. E. 1968: Limits of measurement in magnetic resonance, *J. Sci. Instr. (J. Phys. E) Ser. 2* 1: 977 - 983
- Hochachka, P. W., Mommsen, T. P. 1983: Protons and Anaerobiosis, *Science* 219: 1391 - 1397
- Höfeler, H., Jensen, D., Pike, M. M., Delayre, J. L., Cirillo, V. P., Springer, C. S., Fossel, E. T., Balschi, J. A. 1987: Sodium transport and phosphorus metabolism in sodium-loaded yeast: simultaneous observation with sodium-23 and phosphorus-31 NMR spectroscopy in vivo, *Biochem.* 26: 4953 - 4962
- den Hollander, J. A., Ugurbil, K., Brown, T. R., Shulman, R. G. 1981: Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the effect of oxygen upon glycolysis in yeast, *Biochem.* 20: 5871 - 5880
- den Hollander, J. A., Ugurbil, K., Shulman, R. G. 1986: ^{31}P and ^{13}C NMR studies of intermediates of aerobic and anaerobic glycolysis in *saccharomyces cerevisiae*, *Biochem.* 25: 212 - 219
- Hollis, D. D. 1980: Phosphorus NMR of Cells, Tissues and Organelles, *Biolog. Mag. Res.* 2: 1 - 44
- Hoult, D. I. 1978: The NMR Receiver: A description and analysis of design, *Prog. NMR Spect.* 12: 41 - 77
- Hoult, D. I., Lauterbur, P. 1979: The Sensitivity of the Zeugmatographic Experiment Involving Human Samples, *J. Mag. Res.* 34: 425 - 433
- Hoult, D. I., Richards, R. E. 1976: The Signal-to-Noise Ratio of the Nuclear Magnetic Resonance Experiment, *J. Mag. Res.* 24: 71 - 85
- Kirst, G. O. 1977a: Coordinations of Ionic Relations and Mannitol Concentrations in the Euryhaline Unicellular Alga, *Platymonas subcordiformis* (Hazen) after Osmotic Shocks, *Planta* 135: 69 - 75
- Kirst, G. O. 1977b: The Cell Volume of the Unicellular Alga *Platymonas subcordiformis* Hazen: Effect of the Salinity of the Culture Media and of Osmotic Stresses, *Z. Pflanzenphys.* 81: 386 - 394
- Kirst, G. O. 1977c, Ion Composition of Unicellular Marine and Fresh-Water Algae, with Special Reference to *Platymonas subcordiformis* Cultivated in Media with Different Osmotic Strengths, *Oecologia* 28: 177 - 189
- Kirst, G. O. 1980a: Phosphate Transport in *Platymonas subcordiformis* after Osmotic Stresses, *Z. Pflanzenphysiol.* 97: 289 - 297
- Kirst, G. O. 1980b: Mannitol Accumulation in *Platymonas subcordiformis* After Osmotic Stresses and the Effects of Inhibitors, *Z. Pflanzenphysiol.* 98 (1): 35 - 43
- Kirst, G. O., Bisson, M. A. 1982: Vacuolar and cytoplasmic pH, ion composition and turgor pressure in *Lamprothamnium* as a function of external pH, *Planta* 155: 287 - 295
- Kirst, G. O., Kramer, D. 1981: Cytological evidence for cytoplasmic volume control in *Platymonas subcordiformis* after osmotic stress, *Plant, Cell and Environment* 4: 455 - 462

- Kittel, C. 1973: Einführung in die Festkörperphysik, Oldenbourg München, Wien
- Kjeldstad, B., Johnsson, A. 1987: A ^{31}P -NMR study of *Propionibacterium acnes*, including effects caused by near ultraviolet irradiation, *Biochim. Biophys. Acta* 927: 184 - 189
- Kohlrausch, F., Krüger, F. 1932: Kleiner Leitfaden der Praktischen Physik, 5. Aufl., Teubner Leipzig, Berlin
- Kulaev, I. S., Vagabov, V. M. 1983: Polyphosphate metabolism in Microorganisms, *Adv. Microb. Physiol* 24: 81 - 171
- Kuhl, A. 1974: Phosphorus, in: Stewart, W. D. P. (Hg.): *Algal Physiology and Biochemistry*, Bd. 10, Kap. 23, pp 636 - 654, Blackwell Sci. Publ. Oxford, London
- Küsel, A. 1987: ^{31}P und ^{15}N in vivo NMR-spektroskopische Untersuchungen an der Grünalge *Chlorella fusca*, Dissertation Universität Bremen
- Lakshminarayanaiah, N. 1984: Equations of membrane biophysics, Academic Press Orlando, London
- Lane, A. E., Burris, J. E. 1981: Effects of Environmental pH on the internal pH of *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus quadricauda*, and *Euglena mutabilis*, *Plant Physiol.* 68: 439 - 442
- Lehninger, A. L. 1985: Biochemie, 2. Aufl., Verlag Chemie Weinheim, New York
- Leibfritz, D., Offermann, W., Kuhn, W., Ishikawa, T., Wolf, K. U., Becker, J. 1984: ^{31}P -NMR studies on perfused rat organs (heart, diaphragm, gaster) and on human erythrocytes, in: Govil, G., Khetrapal, C., Sara, A. (Hg.): *Magnetic Resonance in Biology and Medicine*, pp 417 - 427, Tata McGraw Hill New Delhi
- Libore, J. M., Singer, J. R. 1980: Resolution and signal-to-noise relationships in NMR imaging in the human body, *J. Phys. E: Sci. Instr.* 13: 38 - 44
- Liebermann, L. 1888: Über das Nuclein der Hefe und künstliche Darstellung eines Nucleins aus Eiweiss und Metaphosphorsäure, *Ber. dt. chem. Ges.* 21: 598 - 600
- Lilley, R. M. C., Chou, C. J. Mosbach, A., Heldt, H. Q. 1977: The distribution of metabolites between spinach chloroplasts and medium during photosynthesis in vitro, *Biochim. Biophys. Acta* 460: 259 - 272
- MacDonald, J. C., Mazurek, M. 1987: Phosphorus magnetic resonance spectra of open-chain linear polyphosphates, *J. Mag. Res.* 72: 48 - 60
- Mackenzie, I. S. 1986: Nuclear magnetic resonance for measurement, *J. Phys. E: Sci. Instr.* 19: 324 - 333
- Martin, J. B., Bligny, R., Rebeille, F., Douce, R., Leguay, J. J., Mathieu, Y., Guern, J. 1982: A ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance Study of Intracellular pH of Plant Cells Cultivated in Liquid Medium, *Plant Physiol.* 70: 1156 -1161
- Martin, J. B., Klein, G., Satre, M. 1987: ^{23}Na NMR study of intracellular sodium ions in *Dictyostelium discoideum* amoeba, *Arch., Biochem. Biophys.* 254 (2): 559 - 567
- Martin, M. L., Delpuech, J.-J., Martin, G. J. 1980: Practical NMR spectroscopy, Heyden and Sons London

- Mimura, T., Kirino, Y. 1984: Changes in Cytoplasmic pH Measured by ^{31}P NMR in Cells of *Nitellopsis obtusa*, *Plant and Cell Physiol.* 25 (5): 813 - 820
- Mitsumori, F., Ito, O. 1984: Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance of photosynthesizing *Chlorella*, *FEBS Lett.* 174 (2): 248 - 252
- Miyachi, S., Kanai, R., Mihara, S., Miyachi, S., Aoki, S. 1964: Metabolic Roles of Inorganic Polyphosphates in *Chlorella* Cells, *Biochim. Biophys. Acta* 93: 625 - 634
- Navon, G., Ogawa, S., Shulman, R. G., Yamane, T. 1977: ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of Ehrlich ascites tumor cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1): 87 - 91
- Navon, G., Shulman, R. G., Yamane, T., Eccleshall, T. R., Lam, K. B., Baronofsky, J. J., Marmur, J. 1979: Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Studies of Wild-Type and Glycolytic Pathway Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem.* 18 (21): 4487 - 4499
- Nichols, J. W., Deamer, D. W. 1980: Net proton-hydroxyl permeability of large unilamellar liposomes measured by an acid-base titration technique, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2038 - 2042
- Nicolay, K., Hellingerwerf, K. J., Gernerden, H., Kaptein, R., Konings, W. N. 1982: ^{31}P NMR Studies of Photophosphorylation in intact cells of *Chromatium vinosum*, *FEBS Lett.* 138 (2): 249 - 254
- Ogawa, S., Shulman, R. G., Glynn, P., Yamane, T., Navon, G. 1978: On the Measurement of pH in *Escherichia coli* by ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance, *Biochim. Biophys. Acta* 502: 45 - 50
- Ogino, T., den Hollander, J. A., Shulman, R. G. 1983: ^{39}K , ^{23}Na , and ^{31}P NMR studies of ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5185 - 5189
- Ohmori, M., Oh-hama, T., Furihata, K., Miyachi, S. 1986: Effect of Ammonia on Cellular pH of *Anabaena cylindrica* Determined with ^{31}P NMR Spectroscopy, *Plant Cell Physiol* 27 (3): 563 - 566
- Onaka, T., Miyajima, T., Ohashi, S. 1981: On the binding of magnesium to long-chain polyphosphate ions, *J. anorg. nucl. Chem.* 43 (12): 3323 - 3327
- Osborn, J. A. 1945: Demagnetizing Factors of the general ellipsoid, *Phys. Rev.* 67 (11 & 12) 351 - 357
- Ostrovskii, D. N., Sepetov, N. F., Reshetnyak, V. I., Siberl'dina, L. A. 1980: Investigation of the Localisation of Polyphosphates in Cells of Microorganisms by the Method of High-Resolution ^{31}P -NMR-145,78 MHz, *Biokhimiya* 45 (3): 517 - 525 (Engl. Übersetzung)
- Pelmar, J. 1986: Measurement of the distribution of B_1 field in the presence of linear magnetic field gradient, *J. Mag. Res.* 70: 456 - 460
- Pettegrew, J. W., Woessner, D. E., Minshew, N. J., Glonek, T. 1984: Sodium-23 NMR analysis of human whole blood, erythrocytes, and plasma. Chemical shift, spin relaxation, and intracellular sodium concentration studies, *J. Mag. Res.* 57: 185 - 196
- Pike, M. M., Springer, C. S. 1982: Aqueous shift reagents for high-resolution cationic nuclear magnetic resonance (1), *J. Mag. Res.* 46: 348 - 353

- Pike, M. M., Yarmush, D. M., Balschi, J. A., Lenkinski, R. E., Springer, C. S. 1983: Aqueous shift reagents for high-resolution cationic nuclear magnetic resonance. 2. ^{25}Mg , ^{39}K , and ^{23}Na resonances shifted by chelidamate complexes of Dysprosium(III) and Thulium(III), *Inorg. Chem.* 22: 2388 - 2392
- Pike, M. M., Fossel, E. T., Smith, T. W., Springer, C. S. 1984: High-resolution ^{23}Na -NMR studies of human erythrocytes: use of aqueous shift reagents, *Am. J. Physiol* 246 (3): C528 - C536
- Pike, M. M., Frazer, J. C., Dedrick, D. F., Ingwall, J. S., Allen, P. D., Springer, C. S., Smith, T. W. 1985: ^{23}Na and ^{39}K Nuclear magnetic resonance studies of perfused rat hearts - discrimination of intra- and extracellular ions using a shift reagent, *Biophys. J.* 48: 159 - 173
- Raven, J. A. 1984: Energetics and transport in aquatic plants, MBL Lectures in Biology Bd. 4, Liss New York
- Raven, J. A., Smith, F. A. 1980: The chemiosmotic viewpoint, in: Spanswick, R. M., Lucas, W. J., Dainty, J. (Hg.): Plant membrane transport, pp 161 - 178, Elsevier/North-Holland Amsterdam, New York, Oxford
- Rao, N. N., Roberts, M. F., Torriani, A. 1985: Amount and Chain Length of Polyphosphates in *Escherichia coli* Depend on Cell Growth Conditions, *J. Bacteriol* 162 (1): 242 - 247
- Richter, D. 1987: Untersuchung zum D-Mannitolmetabolismus in *Platymonas subcordiformis* Hazen: der Nachweis der beteiligten Enzyme und der Abbau von Reservestärke nach osmotischer Belastung, Dissertation Universität Bremen
- Richter, D. F. E., Kirst, G. O. 1987: D-Mannitol dehydrogenase and D-mannitol-1-phosphate dehydrogenase in *Platymonas subcordiformis*: some characteristics and their role in osmotic adaptation, *Planta* 170: 528 - 534
- Roberts, J. K. M. 1984: Study of plant metabolism in vivo using NMR spectroscopy, *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 35: 375 - 386
- Roberts, J. K. M., Jardetzky, O. 1981: Monitoring of Cellular Metabolism by NMR, *Biochim. Biophys. Acta* 639: 53 - 76
- Roberts, J. K. M., Ray, P. M., Wade-Jardetzky, N., Jardetzky, O. 1980: Estimation of cytoplasmic and vacuolar pH in higher plant cells by ^{31}P NMR, *Nature*: 870 - 872
- Roberts, J. K. M., Wade-Jardetzky, N., Jardetzky, O. 1981: Intracellular pH Measurements by ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance. Influence of Factors Other Than pH on ^{31}P Chemical Shifts, *Biochem.* 20: 5389 - 5394
- Roos, A., Boron, W. F. 1981: Intracellular pH, *Physiol. Reviews* 61: 296 - 434
- Ruyters, G., Oh-hama, T., Kowallik, W. 1985: Phosphate compounds of *Scenedesmus C-2A'* in Darkness or Blue Light as Measured by ^{31}P NMR, *Plant Cell Physiol.* 26 (3): 571 - 578
- Salisbury, J. L., Floyd, G. L. 1978: Calcium-Induced Contraction of the Rhizoplast of a Quadriflagellate Green Alga, *Science* 202: 975 - 977
- Satre, M., Martin, J. B. 1985: ^{31}P -Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Intracellular pH in the Slime Mold *Dictyostelium discoideum*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 132 (1): 140 - 146

- Seo, Y., Murahami, M., Watari, H., Imai, Y., Yoshizaki, K., Nishikawa, H., Morimoto, T. 1983: Intracellular pH Determination by ^{31}P -NMR Technique. The Second Dissociation Constant of Phosphoric Acid in a Biological System, *J. Biochem.* 94: 729 - 734
- Serrano, R. 1984: Plasma Membrane ATPase of Fungi and Plants as a Novel Type of Proton Pump, *Curr. Top. in Cell. Reg.* 23: 87 - 126
- Shaw, D. 1983: In vivo Topical Magnetic Resonance, *Org. Magn. Res.* 21 (4): 225 - 237
- Sianoudis, J. 1986: Untersuchungen zum Energie- und Phosphatmetabolismus der Grünalge *Chlorella fusca* mit in vivo ^{31}P -Kernspinresonanz, Dissertation Universität Bremen
- Sianoudis, J., Küsel, A., Naujokat, T., Offermann, W., Mayer, A., Grimme, L. H., Leibfritz, D. 1985: Respirational activity of *Chlorella fusca* monitored by in vivo P-31 NMR, *Eur. Biophys. J.* 13: 89 -97
- Sianoudis, J., Küsel, A., Mayer, A., Grimme, L. H., Leibfritz, D. 1986a: Distribution of polyphosphates in cell-compartments of *Chlorella fusca* as measured by ^{31}P -NMR-spectroscopy, *Arch. Microbiol.* 144: 48 - 54
- Sianoudis, J., Küsel, A., Leibfritz, D., Grimme, L. H., Mayer, A., 1986b: The Cytoplasmic pH of the Green Alga *Chlorella fusca*, Measured by ^{31}P -NMR Spectroscopy, in: Maret, G., Kiepenheuer, J., Boccara, N. (Hg.): "Biological Effects of Steady Magnetic Fields", pp 221 - 225, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Sianoudis, J., Küsel, A., Mayer, A., Leibfritz, D., Grimme, L. H. 1987: The cytoplasmic pH in photosynthesizing cells of the green alga *Chlorella fusca*, measured by P-31 NMR spectroscopy, *Arch. Microbiol.* 147: 25 - 29
- Sillerud, L. O., Heyser, J. W. 1984: Use of ^{23}Na -nuclear magnetic resonance to follow sodium uptake and efflux in NaCl-adapted and non-adapted Millet (*Panicum miliaceum*) suspensions, *Plant Physiol.* 75: 269 - 272
- Slichter, C. P. 1980: Principles of magnetic resonance, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Smith, F. A., Raven, J. A. 1976: H^+ Transport and Regulation of Cell pH, in: Lüttge, U., Pitman, M. G.: Encyclopedia of plant physiology, Vol. A, Chapter 12, pp 317 - 346, Springer-Verlag Heidelberg, New York
- Tanoue, E., Aruga, Y. 1975: Studies on the Life Cycle and Growth of *Platymonas* sp. in Culture, *Jap. Journ. Bot.* 20 (4): 439 - 460
- Thébault, M. T., Raffin, J. P., Le Gall, J. Y. 1987: In vivo ^{31}P NMR in crustacean muscles: fatigue and recovery in the tail musculature from the prawn *Palaemon elegans*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 145 (1): 453 - 459
- Tijssen, J. P. F., van Steveninck, J. 1984: Detection of a yeast polyphosphate fraction localized outside the plasma membrane by the method of phosphorus-31 nuclear magnetic resonance, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 119 (2): 447 - 451
- Ugurbil, K., Rottenberg, H., Glynn, P., Shulman, R. G. 1978: ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of bioenergetics and glycolysis in anaerobic *Escherichia coli* cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (5): 2244 - 2248
- Watanabe, M., Kohata, K., Kunugi, M. 1987: ^{31}P nuclear magnetic resonance study of intracellular phosphate pools and polyphosphate metabolism in *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada (Raphidophyceae), *J. Phycol.* 23: 54 - 62

Weitzel, G., Pilatus, U., Rensing, L. 1985: Similar dose response of heat shock protein synthesis and intracellular pH in yeast, *Exp. Cell. Res.* 159: 252 - 256

Wiame, J. M. 1948: The occurrence and physiological behavior of two metaphosphate fractions in Yeast, *J. Biol. Chem.* 178: 919 - 929

Wray, V., Schiel, O., Berlin, J., Witte, L. 1985: Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance investigation of the in vivo regulation of intracellular pH in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*: The effects of oxygen supply, nitrogen, and external pH change, *Arch. Biochem. Biophys.* 236 (2): 731 - 740

ANHANG

Anhang I

Die Berechnung von R_m

Die induktiven Verluste werden beschrieben durch die Verlustleistung der in der Probe erzeugten Wirbelströme. Diese entstehen in einem zylindrischen Volumen, dessen Achse senkrecht zu $\vec{B}_1$ steht. Zur Vereinfachung wird anstelle des Zylinders eine Probe in Form einer quadratischen Säule derselben Höhe und desselben Querschnittes, das heißt desselben Volumens, betrachtet. Für die halbe Kantenlänge b des Säulenquerschnittes gilt

$$b = \frac{\sqrt{\pi}}{2} r_p \quad (\text{A1.1})$$

(r_p = Probenradius). Die Höhe wird als Vielfaches von b mit vb bezeichnet (Abb. A1-1).

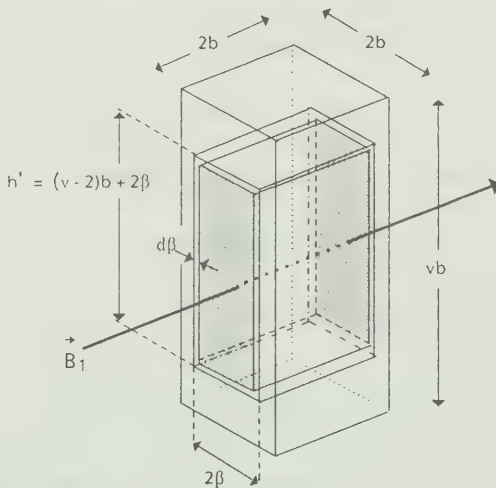


Abbildung A1-1: Schema zur Integration über das Probenvolumen

Die Säulen nehmen wir als parallel zu $B_1^{\rightarrow}$ in gesamter Tiefe $2b$ in konzentrische Rahmen aufgeschnitten an. Die Rahmen haben die Dicke $d\beta$, die Breite 2β und die Höhe

$$h' = (vb - 2b) + 2\beta \quad , \quad (A1.2)$$

wobei β von 0 bis b läuft.

Der Umfang des Rahmens ist dann

$$u = 2 \{[(vb - 2b) + 2\beta] + 2\beta\} = (2v - 4)b + 8\beta \quad . \quad (A1.3)$$

Die Leitfähigkeit um einen Rahmen ist dann

$$dG = \frac{2b}{(2v - 4)b + 8\beta} d\beta \sigma \quad . \quad (A1.4)$$

Die von einem Rahmen umschlossene Fläche ist

$$A = ((vb - 2b) + 2\beta) 2\beta \quad . \quad (A1.5)$$

Um den Rahmen wird die Spannung V_{eff} induziert mit

$$V_{\text{eff}} = -[(vb - 2b) + 2\beta] 2\beta \omega_o B_1 \frac{1}{\sqrt{2}} \quad . \quad (A1.6)$$

Die in der gesamten Säule verlorene Leistung ist

$$W = \int_0^b (V_{\text{eff}}(\beta))^2 dG(\beta) d\beta \quad (A1.7)$$

beziehungsweise nach (A1.4) und (A1.6)

$$W = \frac{\omega_o^2 B_1^2 \sigma}{2} \int_0^b 2b \frac{-(2(v - 2)b\beta + 4\beta^2)^2}{2(v - 2)b + 8\beta} d\beta \quad . \quad (A1.8)$$

Nach Auswertung dieses Integrals über eine rationale Funktion ergibt sich

$$W = \frac{\omega_o^2 B_1^2 b^5}{2} \sigma \xi \quad (A1.9)$$

mit

$$\begin{aligned} \tilde{\xi} = & (1 + (\nu - 2) + \frac{1}{8}(\nu - 2)^2 - \frac{1}{16}(\nu - 2)^3 + \\ & \frac{1}{64}(\nu - 2)^4 \ln \left| \frac{\nu + 2}{\nu - 2} \right|) \quad . \end{aligned} \quad (A1.10)$$

Der Leistungsverlust kann als effektiver Widerstand R_m in Reihe mit der Spule dargestellt werden. Da die Stromamplitude und nicht der Effektivwert betrachtet wird, gilt $R_m \cdot I^2 = 2W$. $\vec{B}_1$ wird als vom induzierten Wirbelstrom unabhängig angesehen, das heißt die Rückwirkung von $\vec{B}_1$ auf $\vec{B}_1$ wird vernachlässigt. Da $\vec{B}_1$ für einen Strom von 1 A bekannt ist - laut Definition hat es den Wert B_1^* - gilt

$$R_m = \omega_o^2 B_1^{*2} b^5 \sigma \cdot \tilde{\xi} \quad . \quad (A1.11)$$

Anhang 2

Die Abschätzung der Photosyntheserate im NMR-Röhrchen

Als Maß für die Photosynthese dient die Sauerstoffproduktion durch die belichteten Organismen.

In der in Kapitel 5.3. beschriebenen Probenkammer wird die Sauerstoffkonzentration im Medium bestimmt durch die Sauerstoffproduktionsrate einerseits, und die Rate, mit der O_2 durch die Stickstoffbegasung aus dem Medium wieder ausgetrieben wird, andererseits.

Es gilt

$$\dot{C}_O = \alpha (C_b - C_O) \gamma_b f_b + \alpha (C_g - C_O) O_g + p_{app} \quad (A2.1)$$

mit

C_O : O_2 -Konzentration im Medium [$mg\ l^{-1}$]

C_b : O_2 -Sättigungskonzentration an der Grenzfläche der durch das Medium geleiteten Gasblasen zum Medium [$mg\ l^{-1}$]

C_g : O_2 -Sättigungskonzentration an der Grenzfläche des Mediums zum darüberliegenden Gasraum - im allgemeinen so groß wie C_b (siehe unten) [$mg\ l^{-1}$]

α : Gasaustauschrate über eine Grenzfläche [$mg\ l^{-1}\ mm^{-2}\ min^{-1}$]

f_b : Durchflußrate des Gases [$ml\ min^{-1}$]

γ_b : Blasenoberfläche im Medium pro Einheit des Gasdurchflusses [$mm^2\ ml^{-1}\ min$]

O_g : Fläche der Grenzfläche Medium - Gasraum [mm^2]

p_{app} : Netto-Produktionsrate für Sauerstoff; bei überwiegender Respiration ist $p_{app} < 0$ [$mg\ l^{-1}\ min^{-1}$].

Bei der Anwendung der Gleichung ist Folgendes zu beachten:

1. Der relevante Gasraum über dem Medium ist ca. 5 ml groß; bei einem Gaszustrom von 40 ml min^{-1} ist er in etwa 7,5 s ausgetauscht, das heißt in einem Zeitraum, der klein gegen die Zeitkonstanten der hier betrachteten Synthese ist. C_g kann also ohne großen Fehler gleich C_b gesetzt werden, da Gasströme von mehr als 40 ml min^{-1} betrachtet werden.
2. Für Luft (mit 21 % O_2) gilt $C_b = C_g \approx 9,3 \text{ mg l}^{-1}$, für reinen Sauerstoff trifft $C_b = C_g \approx 44,3 \text{ mg l}^{-1}$ zu, für Stickstoff ist $C_b = C_g = 0$. (Daten nach Kohlrausch und Krüger (1932). Das Gerät wurde jeweils auf gesättigtes Leitungswasser geeicht.)
3. Die Sauerstoffzehrung der Elektrode mit $7,6 \cdot 10^{-6} \text{ mg min}^{-1}$ (Meßbereich bis ca. 44 mg l^{-1}) beziehungsweise $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mg min}^{-1}$ (Meßbereich bis ca. $9,3 \text{ mg l}^{-1} \hat{=}$ Sättigung mit Luftsauerstoff) ist zu vernachlässigen (Angaben nach Datenblatt für polarographische O_2 -Elektrode VSI 5662).
4. p_{app} setzt sich zusammen aus der Bruttoproduktionsrate abzüglich der Respirationsrate r . r wird genauer durch eine Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben als

$$r = \frac{r_{\max} C_o(t)}{k_m + C_o(t)} .$$

Abweichungen von $r_{\max}$ traten bei Kontrollmessungen erst bei Sauerstoffkonzentrationen auf, die unter den hier betrachteten lagen.

Bei Begasung einer belichteten Probe mit Stickstoff wird Gleichung (A2.1) wegen $C_b = C_g = 0$ zu

$$\dot{C} = -\alpha \gamma_b f_b C_o(t) - \alpha O_g C_o(t) + p_{app} . \quad (A2.2)$$

Im Gleichgewicht, das heißt bei $\dot{C}_o(t) = 0$, gilt

$$p_{app} = \alpha (\gamma_b f_b + O_g) C_o . \quad (A2.3)$$

Der Faktor $\alpha (\gamma_b f_b F_b + O_g)$ kann bestimmt werden als die Rate, mit der Sauerstoff durch Stickstoff im Dunkeln ausgetrieben wird: Wenn die Austreibungsrate bei hohen Sauerstoffkonzentrationen - das heißt nach Sättigung des Mediums mit reinem O_2 statt mit Luft - betrachtet wird, kann die Atmungsrate (gemessen in der Testsuspension: $2,7 \text{ mg l}^{-1} \text{ min}^{-1}$) vernachlässigt werden. Gleichung (A2.1) vereinfacht sich bei Begasung mit N_2 dann zu

$$\dot{C}_O = - \alpha (\gamma_b f_b + O_g) C_O(t) \quad . \quad (A2.4)$$

Die Lösung ist:

$$C_O(t) = C_O(t=0) \exp (-\alpha (\gamma_b f_b + O_g) t) \quad . \quad (A2.5)$$

Umstellen und Logarithmieren ergibt die Austreibungsrate

$$K_b = \alpha (\gamma_b f_b + O_g) :$$

$$K_b = - \frac{1}{t} \ln \frac{C_O(t)}{C_O(t=0)} \quad . \quad (A2.6)$$

K_b wurde für drei verschiedene Durchflußraten f_b aus Sauerstoffkonzentrationskurven nach Umschalten von O_2 - auf N_2 -Begasung im Probenkammermodell nach Abbildung A2-1 bestimmt. In Abbildung A2-2 ist K_b als lineare Funktion von f_b aufgetragen. (Der Wert für $K_b = \alpha O_g$ bei $f_b = 0$ ist nur von theoretischer Bedeutung; eine Entgasung über die Suspensionsoberfläche mit dieser Rate setzt voraus, daß die Suspension so gut verwirbelt wird, daß sich kein Konzentrationsgradient in ihr bildet. Außerdem ist nicht sicher, daß K_b auch bei Werten von f_b unter 40 ml min^{-1} linear von f_b abhängt.)

Mit dem so ermittelten K_b ist p_{app} bestimmt worden als $1,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ($C_O = 1,2 \text{ mg l}^{-1}$ und $K_b = 1,1 \text{ min}^{-1}$ für $f_b = 150 \text{ ml min}^{-1}$).

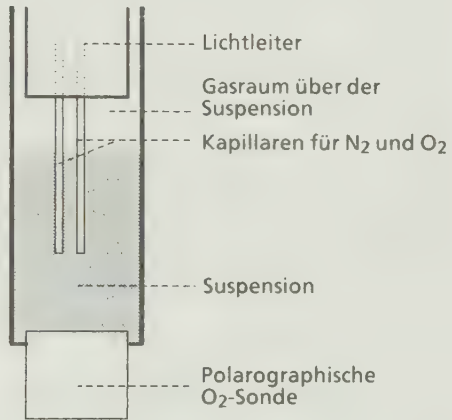


Abbildung A2-1: Probenkammermodell mit O₂-Sonde

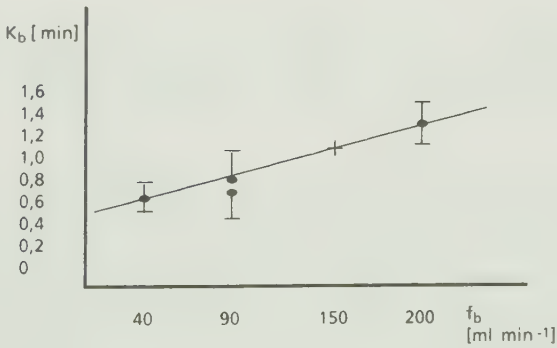


Abb. A2-2: Austreibungsrate als Funktion des Durchflusses

Anhang 3

Das Spektrum des Polyphosphates

Langkettiges polyP (Kettenlänge > 10 Monomere) zeigt ein Spektrum mit vier unterscheidbaren Signalen: dem terminalen (PP-1), zwei präterminalen (PP-2 und PP-3) sowie dem Signal der zentralen Monomere, die drei und mehr Einheiten vom Kettenende entfernt sind (PP-4). Die Kopplungen (Kopplungskonstante $\sim 16 - 18$ Hz) sind auch unter Extraktbedingungen meist nur schlecht aufgelöst. Die Zuordnung der Signale kann durch ein COSY-Spektrum abgesichert werden.

Die Signale PP-1 bis PP-3 sind bei Na-Salzen pH-abhängig, während PP-4 oberhalb von pH 2 vom pH unabhängig ist. Die Verschiebung der Signale PP-1, PP-2 und PP-3 erfolgt mit pK_a -Werten, die der Protonierung der terminalen Phosphatgruppe entsprechen. Diese Gleichheit der pK_a -Werte für PP-1, PP-2 und PP-3 spricht gegen eine Protonierung beziehungsweise Deprotonierung der präterminalen Gruppen. Es wird vermutet, daß sich der durch einen geänderten Protonierungsgrad geänderte Zustand von PP-1 auf die Elektronenhüllen der benachbarten Gruppen auswirkt (MacDonald und Mazurek 1987).

Die Komplexierung von Me^{2+} verschiebt den pK_a zu tieferen Werten. δ wird für PP-4 und PP-3 zu niedrigeren Frequenzen verschoben, für PP-1 im deprotonierten Zustand zu höheren Frequenzen. Im allgemeinen werden die Signale PP-2 bis PP-4 bei Zugabe von Me^{2+} gespreizt.

Oligophosphate (hier entsprechend ihrer Kettenlänge bezeichnet als 2-PP = PP_1 , 3-PP = TP_1 , 4-PP, 5-PP u.s.w.) zeigen ein differenzierteres Kopplungsmuster ihrer Signale. Insbesondere, wenn diese Muster durch Linienverbreiterungen aufgrund von paramagnetischen Verunreinigungen oder Austauscheffekten zwischen verschiedenen Komplexierungszuständen nicht mehr aufgelöst sind, lassen sich auch ihre Signale entsprechend denen der langkettigen Phosphate klassifizieren. Dabei ist zu beobachten, daß 3-PP und 4-PP nur die Signale PP-1 und PP-2 zeigen, 5-PP und 6-PP nur die Signale PP-1 bis PP-3. Ihre Signallagen weichen etwas von entsprechenden der langkettigen Phosphate ab. Die Abweichung bei 3-PP ist am stärksten, sie nimmt mit wachsender Kettenlänge ab.

Die in manchen Zellextraktspektren verwendete Kennzeichnung von polyP-Signalen mit PP-1 bis PP-5 (Navon et al. 1979, Watanabe et al. 1987) beruht darauf, daß das Signal PP-2 von 3-PP, das bei etwas höherer Frequenz als das PP-2-Signal von langkettigem Phosphat liegt, als weitere Gruppe mitgezählt wird. In keinem Falle sind drei präterminale Gruppen langkettiger Phosphate in Extraktspektren getrennt sichtbar.

In wässriger Lösung sind Polyphosphate über die für NMR-spektroskopische Untersuchungen maßgeblichen Zeiten in Abwesenheit biologischen Materials stabil. Das gilt auch bei Anwesenheit zweiwertiger Kationen und bei saurem pH. Feststellbare Anreicherungen von Hydrolyseprodukten wie P_i und PP_i sind auf jeden Fall erst nach Aufbewahrungszeiten von polyP-Lösungen in Größenordnungen von Wochen feststellbar.

Die hier dargestellten Titrationskurven zeigen δ für die verschiedenen Signale zum einen für Na-Salze (bzw. als NH_4 -Salz für 4-PP) und zum anderen als Mg^{2+} -Komplex, wobei jeweils ein Mg^{2+} pro PO_3 -Monomer der Lösung zugefügt ist. Die Darstellungen dienen als Anhaltspunkte für die Identifikation von polyP in Mg^{2+} -freiem und in Mg^{2+} -haltigem Milieu. Kleine Abweichungen der chemischen Verschiebungen sind in Extrakten aufgrund variierender Ionenzusammensetzungen stets zu erwarten.

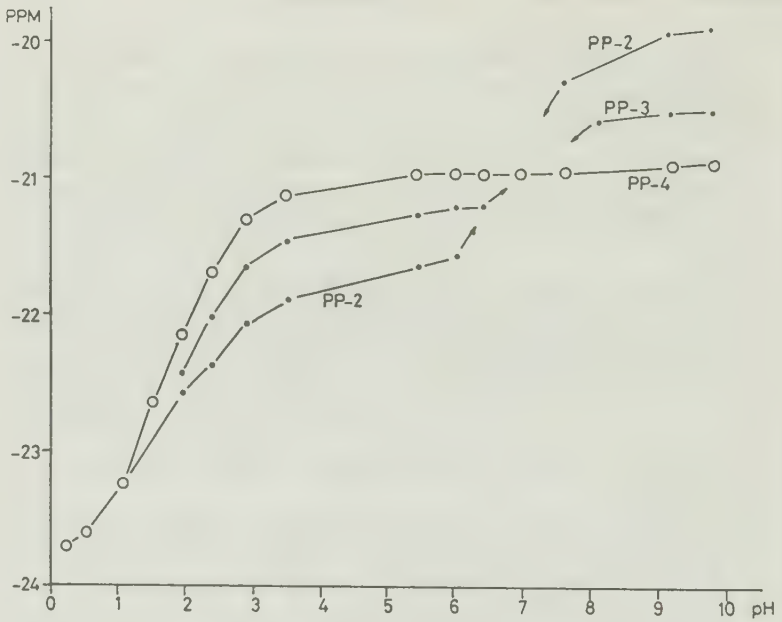


Abbildung A3-1:
Titrationskurven der Signale PP-2, PP-3 und PP-4 von Calgon (15-PP) in
bidestilliertem Wasser ($[\text{PO}_3] = 40 \text{ mmol l}^{-1}$)

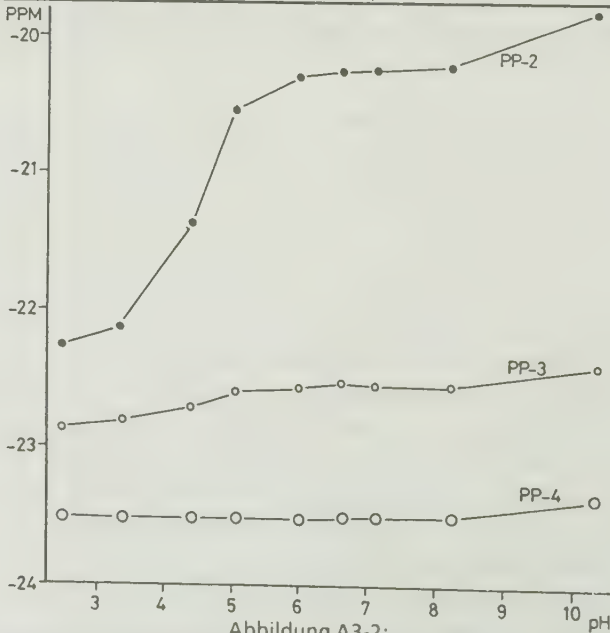


Abbildung A3-2:
Titrationskurven der Signale PP-2, PP-3 und PP-4 von Calgon (15-PP)
($[\text{PO}_3] = 40 \text{ mol l}^{-1}$) nach Zugabe von $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ MgCl}_2$

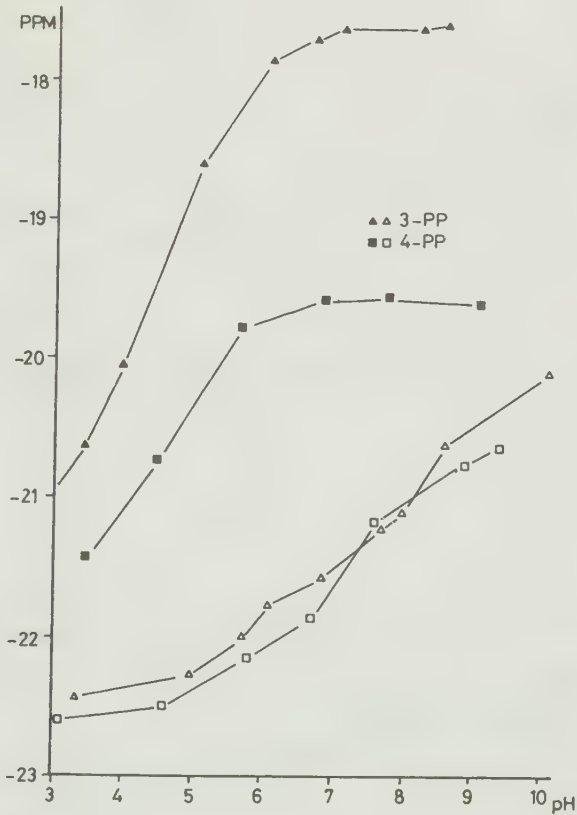


Abbildung A3-3:

Titrationen der Signale PP-2 von 3-PP und 4-PP ($[\text{PO}_3] = 40 \text{ mmol l}^{-1}$); leere Symbole: polyP in bidestilliertem Wasser; gefüllte Symbole: polyP nach Zugabe von $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ MgCl}_2$

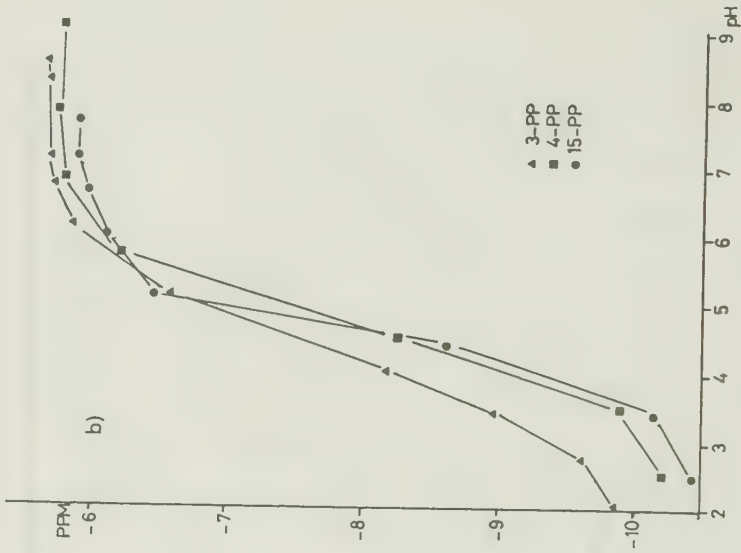
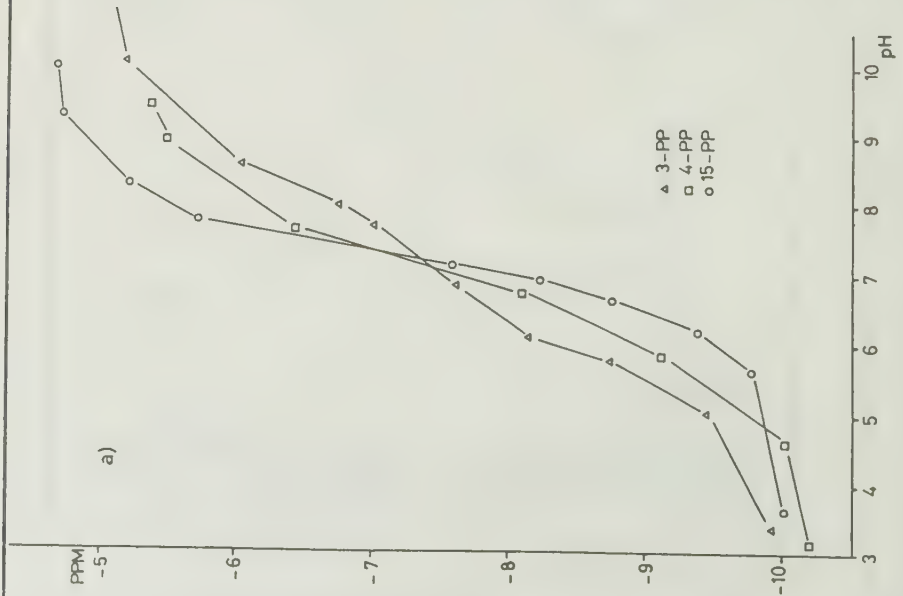


Abbildung A3-4:

Titrationskurven der Signale PP-1 von 3-PP, 4-PP und 15-PP
 ($[\text{PO}_3] = 40 \text{ mmol l}^{-1}$)
 a) in bidestilliertem Wasser
 b) nach Zugabe von $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ MgCl}_2$

Anhang 4

Titrationkurven

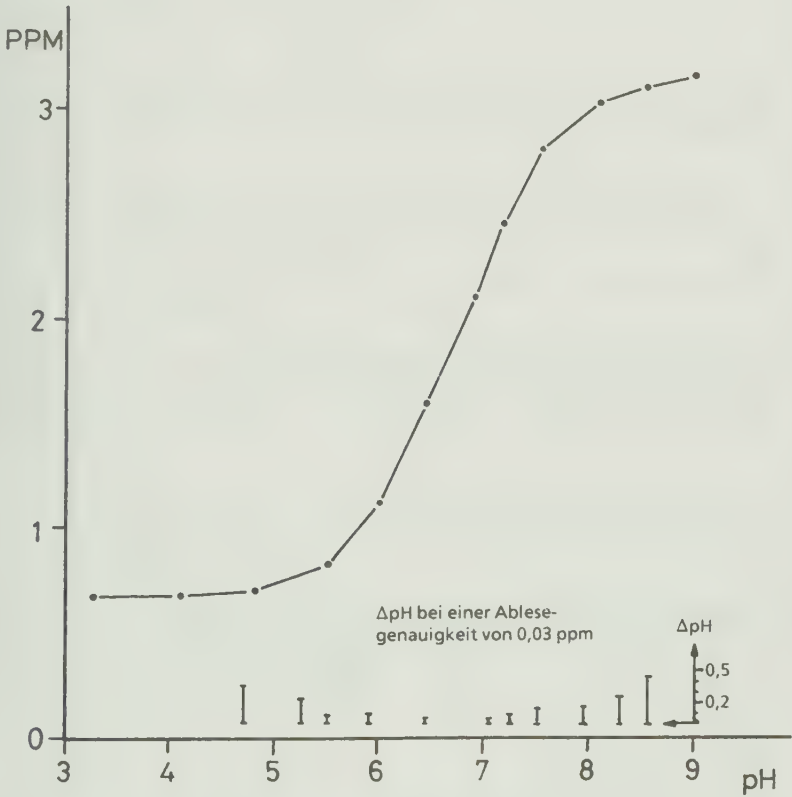


Abbildung A4-1:

Eichkurve für den cytoplasmatischen pH von *Platymonas subcordiformis* (vgl. Kap. 5.4)

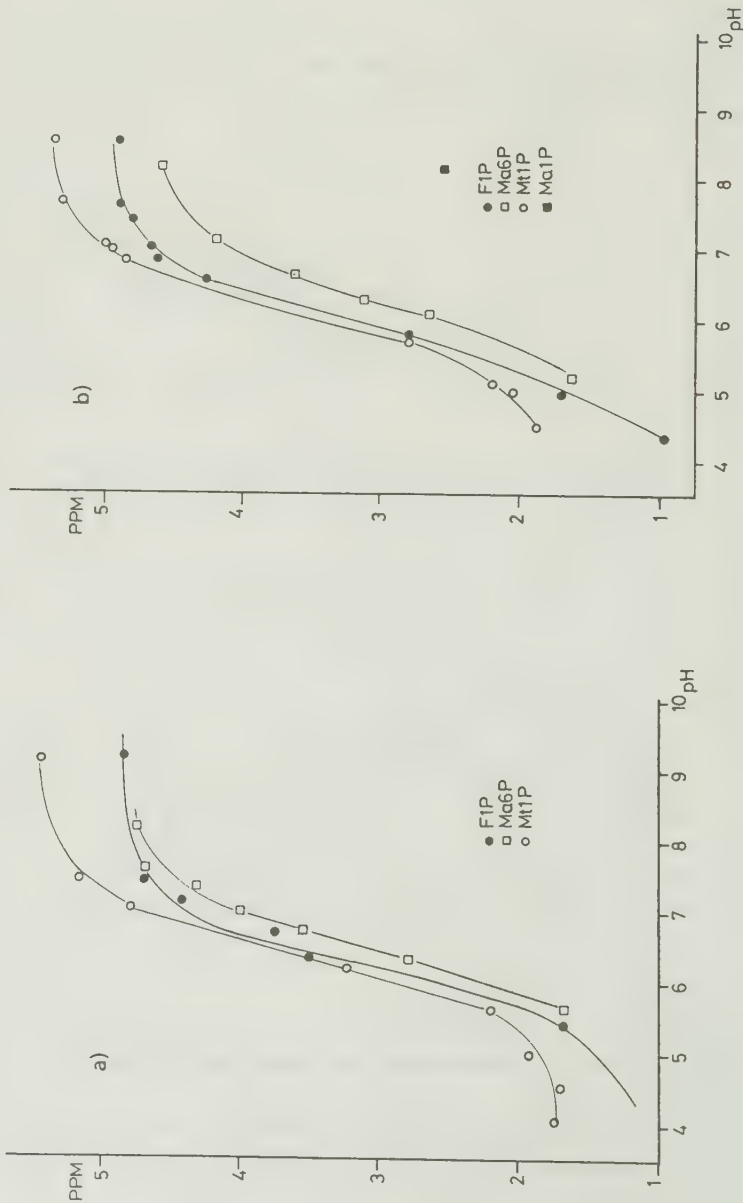


Abbildung A4-2: Titrationskurven einiger Monoester (vgl. Tabelle 4-4)

a) in bidestilliertem Wasser

b) unter Bedingungen ähnlich einem PCA-Extrakt (0,4 mol l⁻¹ KCl + 5 mmol l⁻¹ MgCl₂; F1P bei pH 4,39; 5,80; 6,63 und 6,90 gemessen bei 0,32 mol l⁻¹ KCl + 5 mmol l⁻¹ MgCl₂)

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Mayer-Heinricy für die Anregung zu dieser Arbeit und die vielfältige Unterstützung, die mir ihre Erstellung ermöglichte.

Gleichfalls danke ich Herrn Prof. Dr. D. Leibfritz für seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung, die vor allem in Fragen der Chemie und der NMR-Spektroskopie eine große Hilfe für mich war.

Ohne die Unterstützung aus dem Fachbereich Biologie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. G. O. Kirst für seine stete Bereitschaft, mir den Weg in die mir fremde Landschaft der Biologie zu weisen, und Herrn Dr. D. Richter für seine Hilfe bei der Kultivierung von *Platymonas subcordiformis*.

Mein besonderer Dank gilt den Herren Dr. U. Pilatus und Dr. J. Sianoudis, ohne deren Hilfe ich in die Geheimnisse der in vivo-NMR-Spektroskopie nie eingedrungen wäre und deren Diskussionsbereitschaft stets sehr wichtig für mich war.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. W. Kuhn für seine Hilfe bei meinen ersten Schritten auf dem Gebiet der NMR-Spektroskopie danken.

Bei meinen Kollegen Dr. W. Offermann, R. Callies, T. Gerlitz, C. Köppen, R. Niedermeyer, J. Stelten und W. Werk möchte ich mich für ihre Bereitschaft zur Diskussion und die gute Zusammenarbeit bedanken, wodurch die Arbeit im NMR-Labor sowohl in gerätetechnischer als auch in atmosphärischer Hinsicht stets angenehm war.

Außerdem danke ich Herrn M. Jentzon und Herrn A. Stichternath für ihre Messungen zum Signal-Rausch-Verhältnis am Bruker AM 360 WB, der NMR-Kaffeerunde sowie den Kolleginnen und Kollegen der wissenschaftlichen Einheit "Spektroskopie an kondensierter Materie" für die gute Arbeitsatmosphäre im NW II und im NW I.

In druckreifer Form zu Papier gebracht wurde diese Arbeit von Anne, meiner Frau, die auch die meisten Zeichnungen, unterstützt durch Frau Heike Arlt, erstellte und sich durch meine häufigen nachträglichen Änderungswünsche nicht davon abbringen ließ, sie fertigzustellen.

Und schließlich und endlich gedenke ich der ungezählten Myriaden von Untersuchungsobjekten, die geduldig und ahnungslos alle meine Experimente über sich ergehen ließen, sich des öfteren über die Wechselbäder, die ich ihnen zumutete, wunderten und die mir bis zum Schluß Rätsel aufgaben, die, da ich sie nicht bis ins einzelne lösen konnte, meine Neugierde wachhalten.

Lebenslauf und Bildungsgang

- Geboren am 21. Juni 1954 in Hamburg
- Besuch der Grundschule von 1961 bis 1965 in Hamburg
- Besuch der Heinrich-Hertz-Schule in Hamburg von 1965 bis 1972
- Abitur im Dezember 1972
- Studienbeginn an der Universität Hamburg im April 1973 im Fach Physik/
Nebenfach Informatik
- Einberufung zum Zivildienst
- Wiederaufnahme des Studiums im April 1974
- Anfertigung einer Diplomarbeit auf dem Gebiet der angewandten Optik:
"Videoelektronische Erzeugung von Moiré-Topogrammen"
- Abschluß der Diplomprüfung im Februar 1981
- Tätigkeit am Integrierten Studiengang Wirtschaftsingenieur in Hamburg bei
der Arbeitsgruppe Automatisierungstechnik, zuerst als wissenschaftlicher
Mitarbeiter der Universität Hamburg, dann als wissenschaftlicher Ange-
stellter der Technischen Universität Hamburg-Harburg von 1981 bis 1984
- Einstellung an der Universität Bremen für das von der DFG geförderte
Forschungsvorhaben "³¹P-NMR-Spektroskopie an zellulären Systemen" im
Juni 1984
- Seitdem Arbeit an einer Dissertation auf dem Gebiet der NMR-Spektroskopie
an photosynthetisch aktiven Organismen.

